

530, 987

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. April 2004 (29.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/035622 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07K 14/54**,
19/00, C12N 15/62

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/CH2003/000666

(22) Internationales Anmeldedatum:
13. Oktober 2003 (13.10.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
02022869.8 14. Oktober 2002 (14.10.2002) EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG** [CH/CH]; Gren-
zacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **DREHER, Ingeborg**
[DE/DE]; Gladbacher Strasse 10, 40219 Düsseldorf (DE).
MOLL, Thomas [DE/DE]; Hektorstrasse 17, 10711 Berlin
(DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: **F. HOFFMANN-LA ROCHE**
AG; Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD,
GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: **ANTAGONISTS IL-15**

(54) Bezeichnung: **IL-15 ANTAGONISTEN**

(57) Abstract: The invention relates to fusion proteins consisting of a wild-type IL-15 and a IgG-Fc fragment, apart from a mouse IgG2b fragment, nucleic acids encoding said proteins, vectors, modified cells, and also to the use thereof for preparing drugs which are used, for example for preventing and/or curing disorders resulting from a transplantation and/or autoimmune diseases.

(57) Zusammenfassung: Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Fusionsproteine aus einem Wildtyp-IL-15 und einem IgG-Fc-Fragment, mit Ausnahme eines murinen IgG2b-Fc-Fragmentes, Nukleinsäure die für diese Proteine kodieren, Vektoren, transformierte Zellen und deren Verwendung zur Herstellung von Medikamenten, beispielsweise zur Prophylaxe und/oder Therapie von Transplantationsfolgeerkrankungen und/oder Autoimmunerkrankungen.

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/035622 A2

IL-15 Antagonisten

Die Erfindung betrifft Fusionsproteine aus einem Wildtyp-IL-15 und einem IgG-Fc-Fragment sowie ihre Herstellung und Verwendung zur Inhibierung von Immunreaktionen und zur Prophylaxe und/oder Therapie von Transplantationsfolge- und/oder Autoimmunerkrankungen.

5

Eine effektive Immunantwort wird durch die Aktivierung von T-Zellen des Immunsystems, die durch ein Antigen oder Mitogen ausgelöst wird, eingeleitet. Die Aktivierung der T-Zellen erfordert zahlreiche zelluläre Veränderungen, hierzu gehören z.B. die Expression von Cytokinen und deren Rezeptoren. Zu diesen Cy-
10 tokinen gehören unter anderem IL-15 und IL-2.

IL-15 und IL-2 sind bekannte Wachstumsfaktoren, die eine signifikante Rolle spielen in der Proliferation und Differenzierung von humanen und murinen T-Zellen, Makrophagen, natürlichen Killer (NK)-Zellen, cytotoxischen T-Zellen
15 (CTL), Lymphozyt-aktivierten Killer (LAK)-Zellen sowie in der Kostimulation von B-Zellen, die beispielsweise durch anti-Immunoglobulin (anti-IgM) oder Phorbol-ester aktiviert worden sind. Die Proliferation dieser Zellen verstärkt die Immunantwort eines Organismus.

20 IL-15 wurde erstmals als ein sekretorisches Cytokin beschrieben, das die Proliferation von IL-2 abhängigen murinen cytotoxischen T-Zellen (CTLL-2) induziert. IL-15 wurde als ein 162 Aminosäuren langes Vorläuferprotein mit einer Leader-Sequenz von 48 Aminosäuren, also einem reifen Protein von 114 Aminosäuren Länge, charakterisiert (Grabstein et al., (1994) Science 264(5161):965-8).

25

IL-15 wird in Epithel- und Fibroblast-Zelllinien sowie Monocyten des peripheren Blutes gebildet. Seine spezifische mRNA wurde ebenfalls in Plazenta, Skelettmuskeln und Nieren gefunden (Grabstein et al., supra)

30 Neben den gemeinsamen biologischen Eigenschaften, besitzen IL-15 und IL-2 ebenfalls homologe Strukturen. Beide Moleküle binden an mindestens drei ge-

trennte Rezeptor-Untereinheiten auf der Membran von T-Zellen, wobei der beta- und der gamma-Untereinheit-Komplex über den die Signaltransduktion erfolgt derselbe ist, während die alpha-Untereinheit spezifisch für die Bindung von IL-15 bzw. IL-2 ist. Es konnte festgestellt werden, dass gegen die alpha-Untereinheit des IL-2 Rezeptors gerichtete Antikörper keinen Effekt auf die IL-15 Bindung an seine spezifische alpha-Untereinheit ausüben (Grabstein et al., supra), wohingegen Antikörper, die gegen die beta-Untereinheit des IL-2 Rezeptors gerichtet waren, die Aktivität von IL-15 blockieren (Giri et al., (1994) EMBO J., 13:2822). Über die beta- und gamma-Untereinheiten von IL-15 erfolgt die Signaltransduktion.

10

Bei zahlreichen Krankheiten ist es aus therapeutischen Gründen erforderlich, eine Antwort des Immunsystems des Patienten zu supprimieren. Hierzu gehören beispielsweise Autoimmunkrankheiten, insbesondere Diabetes mellitus Typ I (Bottazzo, G. F., et al., (1985) N Engl J Med 113:353), rheumatische Arthritis, Multiple Sklerose, chronische Lebererkrankungen, entzündliche Darmerkrankungen, Transplantat-anti-Wirt-Krankheit (graft-versus-host disease [GVHD]) und Transplantat-Abstoßung (Sakai et al., (1998) Gastroenterology, 114(6):1237-1243; Kivisakk et al., (1998) Clin Exp Immunol, 111(1):193197).

20 Werden immunkompetente Zellen von einem genetisch nicht identischen Organismus übertragen, so kommt es zur Reaktion dieser Zellen gegen den Empfängerorganismus (GVHD) (Janeway C.A. u. Travers P., Spektrum-Verlag, deutsche Auflage 1995 S. 467).

25 Für viele lebensbedrohende Krankheiten ist die Transplantation von Organen oder Geweben zur Standardmethode und in zahlreichen Fällen zur einzig lebensrettenden Behandlung geworden. Schwierigkeiten gibt es jedoch im Hinblick auf Abstoßungsreaktionen des Empfängerorganismus, die durch Immunantworten auf die fremden Zelloberflächen-Antigene des Transplantats hervorgerufen werden. ,

30

Bei einer Transplantation ist der Grad einer Transplantatabstoßung von dem Ausmaß der histogenetischen Differenz zwischen Spender und Empfänger (Histokompatibilität) abhängig. Unterschiede im Antigenmuster von Spender- und Empfängerorganismus rufen in letzterem eine Immunreaktion, resultierend in einer Abstoßungsreaktion, gegen das Transplantat hervor. Die Abstoßung eines Transplantates findet sowohl durch humorale als auch zelluläre Reaktionen statt. Humorale Effektoren sind Antikörper unterschiedlicher Spezifität, wie z.B. Antikörper-abhängige zellvermittelte Cytotoxizität und Antikörper gegen Strukturen des Spender-HLA-Systems. Zelluläre Effektoren stellen insbesondere cytotoxische T-Zellen in Verbindung mit u.a. Makrophagen dar (Immunologie, Janeway C.A. u. Travers P., Spektrum-Verlag, deutsche Auflage 1995 S. 522-8).

Ein Therapieansatz ist es, die humorale bzw. zelluläre Immunantwort durch Immunsuppressiva, insbesondere antagonistische IL-15 bzw. IL-2-Antikörper bzw. IL-15 bzw. IL-2 Antagonisten zu supprimieren.

Verschiedene Therapien unter Verwendung von Antikörpern gegen IL-15 bzw. IL-2 Moleküle sind beschrieben worden. So konnte beispielsweise die verlängerte Überlebensdauer eines allotransplantierten Primatenherzen durch die Verabreichung des monoklonalen Antikörpers anti-IL-2R.beta (Mik.beta-1) erreicht werden (Tinubu et al., (1994) J Immunol. 153:4330). Weiterhin wurde eine Blockierung der Transplantatabstoßung durch monoklonale Antikörper, die gegen das T-Zell spezifische Antigen CD3 gerichtet waren, beschrieben (Mackie et al., (1990) Transplantation 49:1150).

25

Des weiteren sind zahlreiche IL-15 Antagonisten beschrieben worden, die das Bindungsverhalten von IL-15 an seinen Rezeptor verändern. Diese Antagonisten wurden durch Einführung von Mutation(en) in die Sequenz des Wildtyp-IL-15 erzielt. So wurde beispielsweise eine Mutation an der Aminosäureposition 56 (Aspartat) [Position 8 nach Abspalten der Leader-Sequenz] beschrieben, durch die zwar eine Bindung an die alpha-Untereinheit des IL-15 Rezeptors erfolgte, jedoch

30

die Bindung an die beta-Untereinheit verhindert wurde (WO 96/26274). In einem anderen Ansatz wurde durch eine Mutation an der Aminosäureposition 156 (Glutamin) [Position 108 nach Abspalten der Leader-Sequenz] die Interaktion mit der gamma-Untereinheit inhibiert (WO 96/26274; WO 97/41232). Weiterhin wurde
5 durch PEGyliertes IL-15 eine Bindung an die alpha-Untereinheit ermöglicht. Aus sterischen Gründen war jedoch eine Bindung an die beta-Untereinheit nicht mehr möglich (Pettit et al., (1997) J Biol Chem, 272 4: 2312-2318).

Bei den beschriebenen IL-15 Antagonisten handelt es sich um mutierte IL-15
10 (mut-IL-15) Sequenzen, die entweder für sich oder als Fusionsprotein antagonistische Wirkungen erzielen. Derartige Fusionsproteine sind Polypeptide, bestehend aus einem N-terminalen mut-IL-15-Fragment und einem C-terminalen Fc-Fragment, insbesondere einem murinen IgG2a oder humanen IgG1 (WO 97/41232; Kim et al., (1998) J Immunol., 160:5742-5748).

15 Unter einem Fc (Fragment crystallizable) -Fragment ist das Fragment eines Antikörpers zu verstehen, das keine Antigene bindet. Die beiden weiteren identischen Fab (Fragmentantigen binding) -Fragmente eines Antikörpers haben antigenbindende Aktivität (Immunologie, Janeway C.A. u. Travers P., Deutsche Auflage
20 (1995), S. 117 und folgende).

Nachteil dieser mutierten IL-15 Moleküle ist jedoch, dass sie gegenüber dem Wildtyp-IL-15 eine veränderte Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur besitzen und dadurch abweichende Degradationspunkte aufweisen, so dass Degradations-
25 produkte auftreten, die in den Zellen natürlicherweise nicht vorkommen, und die toxische Wirkung in dem Organismus entfalten können. Art und Ausmaß derartiger und anderer Nebenwirkungen sind im Detail nicht absehbar.

Weiterer Nachteil ist, dass Patienten, die Transplantate in sich tragen, diese in der
30 Regel Zeit ihres Lebens behalten, so dass sie lebenslang auf die Einnahme von Immunsuppressiva angewiesen sind. Vor allem dadurch, dass nur unzureichende

Erkenntnisse über die Nebenwirkungen der Langzeiteinnahme solcher Immunsuppressiva vorliegen, besteht dringender Bedarf, diese Nebenwirkungen auszuschließen oder mindestens einzuschränken.

- 5 Nachgewiesen wurde bei der Verabreichung immunsuppressiver Komponenten, wie Cyclosporine A, FK506 und Rapamycin, dass diese Agenzien die Proliferation von T-Zellen insgesamt inhibieren (Penn, (1991) Transplant Proc, 23:1101; Beveridge et al., (1984) Lancet 1:788).
- 10 Ein großer Nachteil ist, dass die in der Regel systemische Verabreichung solcher Immunsuppressiva zur Verteilung derselben im gesamten Organismus führt und nicht die lokale Präsenz am Ort des/der transplantierten Zellen, Gewebes oder Organs gewährleistet. Die Inhibierung der T-Zellproliferation im gesamten Organismus kann jedoch Infektionen, toxische Abbauprodukte oder sogar Krebs hervor-
- 15 vorrufen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Immunsuppressivum herzustellen, das keine bzw. kaum Nebenwirkungen in einem Organismus entfaltet, in welchem eine Immunantwort inhibiert werden soll.

20

Es ist bekannt, dass mutierte IL-15 Moleküle oder Fusionsproteine, bestehend aus einem mut-IL-15 und einem Fc-Fragment eine antagonistische Wirkung auf IL-15 entfalten, indem sie das Rezeptorbindungsverhalten inhibieren oder verändern.

- 25 Völlig überraschend war allerdings, dass auch ein Fusionsprotein, bestehend aus einem N-terminalen Wildtyp-IL-15 und einem C-terminalen Fc-Fragment, insbesondere einem murinen IgG2a, ebenfalls eine antagonistische Wirkung entfaltet, obwohl an sich eine agonistische Wirkung zu erwarten wäre. Lediglich durch das Anfügen eines Fc-Fragments an ein natürlich vorkommendes, im Normalfall ein
- 30 immunstimulierendes IL-15 Molekül konnte der Wirkmechanismus, umgekehrt werden, also die Inhibierung einer Immunantwort erreicht werden.

Überraschend war diese Erkenntnis gerade deshalb, weil bei der Annahme einer natürlichen Faltung des Wildtyp-IL-15-Abschnitts des Fusionsproteins nicht davon auszugehen war, dass das Rezeptorbindungsverhalten allein durch das ange-
fügte Fc-Fragment derart veränderbar ist, dass das gesamte Molekül Wildtyp-IL-
15-Fc antagonistische Wirkung zum Wildtyp-IL-15 entfaltet.

Ein Gegenstand der Erfindung ist daher ein Fusionsprotein aus einerseits einem Wildtyp-IL-15 und andererseits einem IgG-Fc-Fragment, mit Ausnahme eines
murinen IgG2b-Fc-Fragments.

Unter einem Fusionsprotein gemäß der vorliegenden Erfindung ist das Expressionsprodukt eines fusionierten Gens zu verstehen. Ein fusioniertes Gen entsteht aus der Verknüpfung zweier oder mehrerer Gene oder Genfragmente, wodurch
eine neue Kombination entsteht.

Unter einem Wildtyp-IL-15 gemäß der vorliegenden Erfindung wird das natürlich vorkommende IL-15 verstanden, wie beispielsweise in Grabstein et al., (1994) Science 264(5161):965-8 beschrieben oder allelischen Varianten davon.

Unter einem Fc(Fragment crystallizable)-Fragment ist das Fragment eines Antikörpers zu verstehen, das keine Antigene bindet, beispielsweise ein Antikörpermolekül, dem die variablen Domänen fehlten, oder auch teilweise oder vollständig die erste konstante Domäne der schweren und leichten Ketten. Das Fc-Fragment
kann aus natürlicher Quelle stammen, rekombinant hergestellt werden und/oder synthetisiert werden. Entsprechende Methoden sind dem Fachmann bekannt.

Bei dem Fc-Fragment des erfindungsgemäßen Fusionsproteins handelt es sich um ein ImmunglobulinG (IgG) und zwar um ein humanes oder murines IgG1, ein
humanes IgG2, ein murines IgG2a, ein humanes oder murines IgG3 oder ein humanes IgG4, vorzugsweise um ein humanes IgG1 oder ein murines IgG2a, insbe-

sondere um ein IgG1. Vorzugsweise wurden die IgG's ab der Hinge-Region verwendet. Als Hinge-Region wird die flexible Region im Ig-Molekül bezeichnet.

Unter erfindungsgemäßen IgG's sind beispielsweise folgende beschriebene IgG's zu verstehen:

humanes IgG1 (Paterson, T. et al., (1998), Immunotechnology 4(1):37-47, murines IgG2a (Sikorav, J.L., (1980), Nucleic Acids Res. 8(14):3143-3155), murines IgG1 (French et al., (1991), J. Immunol. 146(6):2010-2016, humanes IgG2 (Krawinkel, U. und Rabbitts, T.H., (1982), EMBO J. 1(4):403-407; Wang et al., (1980), J. Immunol. 125(3):1048-1054), murines IgG2b (Schlomchik, M.J., (1987), Nature 328, 805-811), humanes IgG3 (Huck, S. et al., (1986), Nucleic Acids Res. 14(4):1779-1789), murines IgG3 (Wels et al., (1984), EMBO J., 3(9):2041-2046) und humanes IgG4 (Pink et al., (1970), Biochem. J., 117(1):33-47) beschrieben worden.

Vorzugsweise ist das erfindungsgemäße Fusionsprotein ein chimäres Fusionsprotein, beispielsweise enthaltend ein Wildtyp-IL-15 und ein heterologes IgG1-Fc-Fragment oder ein heterologes IgG2a-Fc-Fragment.

In bevorzugten Ausführungsformen umfasst das erfindungsgemäße Fusionsprotein die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:5.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft eine Nukleinsäure, die für ein Fusionsprotein kodiert, das einerseits ein Wildtyp-IL-15 und andererseits ein IgG-Fc-Fragment, mit Ausnahme eines murinen IgG2b-Fc-Fragments, enthält.

Vorzugsweise kodiert die erfindungsgemäße Nukleinsäure für ein Wildtyp-IL-15 und ein humanes oder murines IgG1, ein humanes IgG2, ein murines IgG2a, ein humanes oder murines IgG3 oder ein humanes IgG4, besonders bevorzugt für ein humanes IgG1 oder ein murines IgG2a, am bevorzugtesten für ein IgG1.

Bevorzugt kodiert die erfindungsgemäße Nukleinsäure ein Fusionsprotein mit einer der Aminosäuresequenzen SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:5.

5

In bevorzugten Ausführungsformen enthält die erfindungsgemäße Nukleinsäure die DNA-Sequenzen SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 oder SEQ ID NO:10.

- 10 Unter einer Nukleinsäure im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man eine RNA oder DNA, insbesondere genomische DNA, cDNA oder synthetische DNA, die beispielsweise auf Phosphoramidierungsebene synthetisiert wurde. Ebenfalls sind Kombinationen und/oder Modifikationen von Nukleotiden dieser Nukleinsäuren umfasst. Weiterhin umfasst dieser Begriff einzel- und doppelsträngige
- 15 Nukleinsäuren.

- Ebenso umfasst sind Nukleinsäuren, die funktionell verknüpfte Komponenten beinhalten, beispielsweise ein oder mehrere fusionierte Gene oder aktive Teile davon kodierend für ein oder mehrere erfindungsgemäße Fusionsproteine sowie
- 20 regulierbare Elemente und/oder regulative Nukleotidsequenzen, die die Expression des/der Gene mengenmäßig und/oder zeitabhängig beeinflussen.

Regulierbare Elemente sind beispielsweise Promotoren für die konstitutive oder zell- bzw. gewebsspezifische Expression.

25

Regulative Nukleotidsequenzen umfassen beispielsweise Leadersequenzen, Polyadenylierungssequenzen, z.B. ein SV40-Polyadenylierungssignal, Enhancersequenzen, IRES-Sequenzen und Introns.

- 30 Bevorzugte Leadersequenzen der vorliegenden Erfindungen sind beispielsweise die nachfolgend aufgeführten:

Igk-Leader:

5'-ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCC
AGGTTCCACTGGTGAC -3',

5

CD5-Leader:

5'-ATGCCCATGGGGTCTCTGCAACCGCTGGCCACCTTGTACCTGCTGGG
GATGCTGGTCGCTTCCTGCCTCGGA-3',

10 CD4-Leader:

5'-ATGAACCGGGGAGTCCCTTTTAGGCACTTGCTTCTGGTGCTGCAACT
GGCGCTCCTCCCAGCAGCCACTCAGGGA-3',

IL-2-Leader:

15 5'-ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCAATTGCACTAAGTCTTGCACT
TGTCACAAACAGT-3',

20 MCP-Leader:

5'-TGAAAGTCTCTGCCGCCCTTCTGTGCCTGCTGCTCATAGCAGCCACC
TTCATTCCCCAAGGGCTCGCT-3',

kurzer nativer IL-15-Leader:

25 5'-ATGTCTTCATTTTGGGCTGTTTCAGTGCAGGGCTTCCTAA-3'

langer nativer IL-15-Leader:

ATGAGAATTTGAAACCACATTTGAGAAGTATTTCCATCCAGTGCTACTTGTGTT
TACTTCTAAACAGTCATTTTCTAACTGAAGCTGGCATTTCATGTCTTCATTTTGGG

30 CTGTTTCAGTGCAGGGCTTCCTAAACAGAAGCC

Die Komponenten sind funktionell verknüpft, wenn sie derart verbunden sind, dass unter dem Einfluss der Transkriptionsregulation die Sequenz(en) der bzw. des enthaltenen Gene bzw. Gens transkribiert werden bzw. wird.

- 5 Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Vektor, der mindestens eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthält.

Vektoren im Sinne der vorliegenden Erfindung können Plasmide, Shuttle-Vektoren, Phagemide, Cosmide, adenovirale Vektoren, retrovirale Vektoren, Ex-
10 pressionsvektoren und gentherapeutisch wirksame Vektoren sein.

Expressionsvektoren im Sinne der vorliegenden Erfindung umfassen mindestens eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, mindestens ein Translations-Initiations-Signal, ein Translations-Terminations-Signal und/oder ein Polyadenylierungs-
15 Signal zur Expression in Eukaryoten.

Kommerziell erhältliche Expressionsvektoren, insbesondere zur Expression in Säugetierzellen, beispielsweise pIRES (Fa. Clontech, Palo Alto, USA), pCI-neo Vektor (Fa. Promega, Madison, USA), pCMV-Script (Fa. Stratagene, La Jolla,
20 USA) und pCDNA Vektor (Fa. Invitrogen, Paisley, UK), sind zum Einbau der erfindungsgemäßen NS geeignet.

Erfindungsgemäße gentherapeutisch wirksame Vektoren sind zum Beispiel Virusvektoren, beispielsweise Adenovirus-Vektoren, retrovirale Vektoren oder Vek-
25 toren, die auf Replikons von RNA Viren beruhen (Lindemann et al., 1997, Mol. Med. 3: 466-76; Springer et al., 1998, Mol. Cell. 2: 549-58; Khromykh, 2000, Curr. Opin. Mol. Ther.; 2: 555-69).

Gentherapeutisch wirksame Vektoren lassen sich auch dadurch erhalten, dass man die erfindungsgemäßen Nukleinsäure-Fragmente mit Liposomen komplexiert. Bei der Lipofektion werden kleine unilamellare Vesikel aus kationischen Lipiden durch Ultraschallbehandlung der Liposomensuspension hergestellt. Die DNA wird ionisch auf der Oberfläche der Liposomen gebunden, und zwar in einem solchen Verhältnis, dass eine positive Nettoladung verbleibt und die Plasmid-DNA zu 100% von den Liposomen komplexiert wird. Neben den Lipidmischungen DOTMA (1,2-dioleoyloxypropyl-3-trimethylammoniumbromid) und DPOE (dioleoylphosphatidylethanolamin) wurden inzwischen zahlreiche neue Lipidformulierungen synthetisiert und auf ihre Transfektionseffizienz bei verschiedenen Zelllinien getestet. (Behr et al. 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6982-6986; Gao und Huang, 1991, Biochem. Biophys. Acta 1189, 195-203; Felgner et al. 1994, J. Biol. Chem. 269, 2550-2561). Beispiele der neuen Lipidformulierungen sind DOTAP N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethyl-ammoniummethyl-sulfat oder DOGS (TRANSFECTAM; diocta-decylamidoglycylspermin). Hilfsstoffe, die den Transport von Nukleinsäuren in die Zellen erhöhen, können beispielsweise Proteine oder Peptide, die an DNA gebunden sind oder synthetische Peptid-DNA-Moleküle, die den Transport der Nukleinsäure in den Kern der Zelle ermöglichen, sein (Schwartz et al., 1999, Gene Therapy 6: 282; Branden et al. 1999, Nature Biotech. 17: 784). Hilfsstoffe umfassen auch Moleküle, die die Freisetzung von Nukleinsäuren in das Zytoplasma der Zelle ermöglichen (Planck et al., 1994, J. Biol. Chem. 269, 12918; Kichler et al., 1997, Bioconj. Chem. 8, 213) oder beispielsweise Liposomen (Uhlmann und Peimann, 1990, Chem. Rev. 90, 544).

25

Ein Gegenstand der Erfindung ist eine Zelle, die mindestens eine erfindungsgemäße Nukleinsäure und/oder mindestens einen erfindungsgemäßen Vektor enthält.

Bevorzugt handelt es sich bei dieser Zelle um eine Vorläuferzelle, eine immortalisierte Zelle oder eine Stammzelle, insbesondere eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle. Derartige pluripotente embryonale Stammzellen oder Zelllinien können aus der inneren Zellmasse von

5 Blastozyten gewonnen werden (Robertson, Embryo-derived stem cell lines, in Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach, Robertson, editor, IRL Press, Washington DC, 1987). Besonders bevorzugte Stammzellen, die aus adultem Gewebe stammen, umfassen z.B. neuronale Stammzellen, Stammzellen aus dem Knochenmark, mesenchymale Stammzellen, hämatopoetische

10 Stammzellen, epitheliale Stammzellen, Stammzellen aus dem Verdauungstrakt und Duktus Stammzellen.

Erfindungsgemäße Zellen sind beispielsweise Epithelzellen, Gefäßzellen, Leberzellen, Herzzellen, Hautzellen, Muskelzellen, Nervenzellen, Knochmarkzellen,

15 CHO-Zellen (Ovarzellen) und Zellen aus der Bauchspeicheldrüse, aus der Niere, aus dem Auge oder aus der Lunge.

Die erfindungsgemäße Zelle ist insbesondere eine Säugetierzelle, inklusive einer humanen Zelle. Diese Zelle kann beispielsweise aus einem Menschen, einer

20 Maus, einer Ratte, einem Meerschweinchen, einem Kaninchen, einer Kuh, einer Ziege, einem Schaf, einem Pferd, einem Schwein, einem Hund, einer Katze oder einem Affen, vorzugsweise aus einem Menschen, stammen.

Die erfindungsgemäßen Zellen können auch zur Expression eines heterologen

25 Gens verwendet werden.

Vorzugsweise liegt die erfindungsgemäße Zelle in Form einer Zelllinie vor. Eine erfindungsgemäße Zelllinie kann hergestellt werden durch Transfektion, Transformation oder Infektion einer Zelllinie mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure

30 re oder einem erfindungsgemäßen Vektor mit Hilfe von Methoden, die dem

Fachmann geläufig sind, beispielsweise Transfektion, Transformation, Elektroporation, Mikroinjektion oder Infektion.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Arzneimittel enthaltend mindestens
- 5 ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein, mindestens eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, mindestens einen erfindungsgemäßen Vektor und/oder mindestens eine erfindungsgemäße Zelle und gegebenenfalls geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.
- 10 Geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe, die beispielsweise der Stabilisierung oder Konservierung des Arzneimittels oder Diagnostikums dienen, sind dem Fachmann allgemein bekannt. Beispiele für solche Hilfs- und/oder Zusatzstoffe sind physiologische Kochsalzlösungen, Ringer-Dextrose, Dextrose, Ringer-Laktat, entmineralisiertes Wasser, Stabilisatoren, Antioxidantien, Komplexbildner, antimikrobielle Verbindungen, Proteinaseinhibitoren und/oder inerte Gase.
- 15

Das erfindungsgemäße Arzneimittel kann z.B. zur Prophylaxe, Therapie oder Diagnose von Erkrankungen dienen. Zu diesen Krankheiten gehören beispielsweise:

- rheumatischen Erkrankungen, beispielsweise rheumatische Arthritis,
- 20 Sjögren's Syndrom, Skleroderma, Dermatomyositis, Polymyositis, Reiter's Syndrom oder Behcet's Krankheit,
- Diabetes Typ I oder Typ II,
- Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse, beispielsweise Morbus Basedow Krankheit, Hashimoto's Thyroiditis,
- 25 • Autoimmunerkrankungen des zentralen Nervensystems, beispielsweise Multiple Sklerose,
- Hauterkrankungen, beispielsweise Psoriasis, Neurodermitis,
- entzündliche Darmerkrankungen, beispielsweise Morbus Crohn,

- 14 -

- Immunstörungserkrankungen, beispielsweise AIDS
 - Gefäßerkrankungen,
 - Transplantationsfolgeerkrankungen, beispielsweise Transplantatabstoßungsreaktionen und
- 5 • Tumorerkrankungen.

Die Verabreichung des erfindungsgemäßen Arzneimittels erfolgt nach den dem Fachmann geläufigen Methoden, beispielsweise intravenös, intraperitoneal, intramuskulär, subkutan, intrakranial, intraorbital, intrakapsulär, intraspinal, trans-

10 muskulär, topikal oder oral. Weitere Methoden der Verabreichung sind beispielsweise die systemische oder lokale Injektion, die Perfusion oder die Katheterbasierte Verabreichung.

Das erfindungsgemäße Arzneimittel kann beispielsweise in oralen Darreichungs-

15 form, wie z.B. Tabletten oder Kapseln, über die Mucous-Membran, z.B. die Nase oder die Mundhöhle, in Form von Sprays in die Lunge oder in Form von Dispositiven unter die Haut implantiert, verabreicht werden. Trans-dermaltherapeutische Systeme (TTS) sind z.B. aus EP 0 944 398-A1, EP 0 916 336-A1, EP 0 889 723-A1 oder EP 0 852 493-A1 bekannt.

20

Das Arzneimittel kann in den Organismus eingebracht werden entweder mit Hilfe eines *ex vivo* Ansatzes, bei dem die Zellen aus dem Patienten entfernt, genetisch modifiziert, beispielsweise durch DNA-Transfektion, und danach erneut in den Patienten eingeführt werden oder mit Hilfe eines *in vivo* Ansatzes, bei welchem

25 erfindungsgemäße gentherapeutisch wirksame Vektoren in den Körper des Patienten eingebracht werden, als nackte DNA oder unter Verwendung von viralen oder nicht-viralen erfindungsgemäßen Vektoren oder erfindungsgemäßen Zellen. ,

Im Stand der Technik ist bekannt, dass die Dosierung von Arzneimitteln von mehreren Faktoren abhängt, beispielsweise von dem Körpergewicht, dem generellen Gesundheitszustand, dem Ausmaß der Körperoberfläche, dem Alter des Patienten sowie der Wechselwirkung mit anderen Medikamenten. Eine Dosierung hängt
5 ebenfalls ab von der Art der Verabreichung. Die Dosierung ist daher im Einzelfall für jeden Patienten vom Fachmann zu bestimmen. Die Verabreichung des Arzneimittels kann einmal oder mehrmals am Tag und über mehrere Tage hinweg erfolgen, auch dies ist vom Fachmann bestimmbar.

- 10 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein humanes oder tierisches organspezifisches Gewebe und/oder ein humanes oder tierisches Säugetierorgan, enthaltend mindestens ein Fusionsprotein, mindestens eine Nukleinsäure kodierend für das genannte Fusionsprotein, mindestens einen Vektor enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder mindestens eine Zelle enthaltend mindestens
15 eine genannte Nukleinsäure und/oder mindestens einen genannten Vektor, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc-Fragment enthält.

Bevorzugt enthält das Fusionsprotein des erfindungsgemäßen humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder des erfindungsgemäßen humanen
20 oder tierischen Säugetierorgans einerseits ein Wildtyp-IL-15 und andererseits ein humanes oder murines IgG1, ein humanes IgG2, ein murines IgG2a, ein murines IgG2b, ein humanes oder murines IgG3 oder ein humanes IgG4, bevorzugt ein humanes IgG1 oder ein murines IgG2a, insbesondere ein IgG1, besonders bevorzugt kein murines IgG2b.

25

Humanes oder tierisches organspezifisches Gewebe der vorliegenden Erfindung kann beispielsweise Gewebe aus der Bauchspeicheldrüse, einschließlich beispielsweise der Langerhanschen Inselzellen, sowie Herz-, Herzmuskel-, Nieren-, Leber-, Lungen-, Milz-, Knorpel-, Bänder-, Retina-, Hornhaut-, Knochenmark-,
30 Haut-, Nerven- und/oder Muskelgewebe sein.

Humane oder tierische Säugetierorgane der vorliegenden Erfindung können z.B. die Bauchspeicheldrüse, das Herz, die Bauchspeicheldrüse, die Niere, die Leber, die Lunge, die Milz, das Auge und/oder die Haut sein.

5

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein transgenes nicht-humanes Säugetier, welches mindestens ein Fusionsprotein, mindestens eine Nukleinsäure, die für das genannte Fusionsprotein kodiert, mindestens einen Vektor, der mindestens eine genannte Nukleinsäure enthält und/oder mindestens eine Zelle, die mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder mindestens einen genannten Vektor enthält, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc-Fragment enthält.

10

Bevorzugt enthält das Fusionsprotein des erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugetiers einerseits ein Wildtyp-IL-15 und andererseits ein humanes oder murines IgG1, ein humanes IgG2, ein murines IgG2a, ein murines IgG2b, ein humanes oder murines IgG3 oder ein humanes IgG4, bevorzugt ein humanes IgG1 oder ein murines IgG2a, insbesondere ein IgG1, besonders bevorzugt kein murines IgG2b.

15

Transgene Tiere zeigen im allgemeinen eine gewebespezifisch erhöhte Expression von Nukleinsäuren und sind daher für die Analyse beispielsweise von Immunreaktionen sehr geeignet. Bevorzugt werden transgene Mäuse verwendet.

20

Ein erfindungsgemäßes nicht-humanes Säugetier ist beispielsweise eine Maus, eine Ratte, ein Meerschweinchen, ein Kaninchen, eine Kuh, eine Ziege, ein Schaf, ein Pferd, ein Schwein, ein Hund, eine Katze oder ein Affe.

25

Ebenfalls weitere Gegenstände der Erfindung sind die Verwendungen eines Fusionsproteins, einer Nukleinsäure kodierend für das genannte Fusionsprotein, eines Vektors enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder einer Zelle enthaltend entweder mindestens eine genannte Nukleinsäure oder/und einen ge-

30

nannten Vektor enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc-Fragment enthält, oder eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen Säugetierorgans:

- 5 · zur Inhibierung eines IL-15 vermittelten zellulären Ereignisses,
- zur Inhibierung der Interaktion eines IL-15 mit seinem Rezeptor und/oder
- zur Prophylaxe und/oder Therapie von Transplantationsfolgeerkrankungen, insbesondere Transplantationsabstoßungsreaktionen, und/oder Autoimmunerkrankungen.

10

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines Fusionsproteins, einer Nukleinsäure kodierend für das genannte Fusionsprotein, eines Vektors enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder einer Zelle enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder einen genannten Vektor, wobei
15 das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc-Fragment enthält, zur Lyse von Zellen, die einen IL-15-Rezeptor exprimieren.

Bevorzugt enthält das Fusionsprotein der erfindungsgemäßen Verwendungen einerseits ein Wildtyp-IL-15 und andererseits ein humanes oder murines IgG1, ein
20 humanes IgG2, ein murines IgG2a, ein murines IgG2b, ein humanes oder murines IgG3 oder ein humanes IgG4, bevorzugt ein humanes IgG1 oder ein murines IgG2a, insbesondere ein IgG1, besonders bevorzugt kein murines IgG2b.

Vorzugsweise erfolgen die erfindungsgemäßen Verwendungen in bzw. bei einem
25 humanen oder tierischen Säugetier. Unter einem humanen Säugetier im Sinne der vorliegenden Erfindung ist ein Mensch zu verstehen, unter einem tierischen Säugetier im Sinne der vorliegenden Erfindung ist beispielsweise eine Maus, eine Ratte, ein Meerschweinchen, ein Kaninchen, eine Kuh, eine Ziege, ein Schaf, ein Pferd, ein Schwein, ein Hund, eine Katze oder ein Affe zu verstehen.

30

Weiterhin ist ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung die Verwendung des erfindungsgemäßen humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder erfindungsgemäßen humanen oder tierischen Säugetierorgans zur Transplantation in ein humanes oder tierisches Säugetier. Bevorzugt handelt es sich um
5 eine Auto-, Allo- oder Xenotransplantation.

Die Transplantation ist die Übertragung von lebendem Material, z.B. von Zellen, Gewebe oder Organen, von einem Teil des Körpers auf einen anderen (autogene Transplantation) oder von einem Individuum auf ein anderes (alogene, syngene
10 und xenogene Transplantation) (Klein, J. S, (1991) Immunologie, 1. Auflage, VHC Verlagsgesellschaft, Weinheim, S. 483) nach dem Fachmann allgemein bekannten Verfahren. Bei der Transplantation in einen anderen Organismus wird unterschieden in die

- Synotransplantation, bei der Spender und Empfänger derselben Spezies angehören und genetisch völlig oder weitgehend identisch sind,
15
- Allotransplantation, bei der Spender und Empfänger derselben Spezies angehören, aber immungenetisch different sind und
- Xenotransplantation, bei der Spender und Empfänger nicht derselben Spezies angehören und demzufolge immungenetisch völlig different sind.

20

Ebenfalls ein Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Fusionsproteins, das die folgenden Schritte enthält:

- a. Einbringen mindestens einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure und/oder mindestens eines erfindungsgemäßen Vektors in eine Zelle, und
25
- b. Expression der Nukleinsäure unter geeigneten Bedingungen.

Verfahren zum Einbringen von Nukleinsäuren, Vektoren und Genen, beispielsweise Differenzierungs-Markergenen oder Transfektions-Markergenen, in Zellen sind dem Fachmann gut bekannt und umfassen die nach dem Stand der Technik
30 üblichen Verfahren, beispielsweise Elektroporation, Injektion, Transfektion

und/oder Transformation. Diese Verfahren sind insbesondere bevorzugt, wenn es sich bei der Substanz um nackte Nukleinsäuren, insbesondere DNA, handelt.

Geeignete Bedingungen für die Expression der Nukleinsäure können beispielsweise durch Expressionsvektoren, beispielsweise durch vorangehend genannte Expressionsvektoren und regulierbare Elemente, beispielsweise Promotoren oder regulative Nukleinsäuresequenzen geschaffen werden. Im allgemeinen enthalten Expressionsvektoren auch für die jeweilige Zelle bzw. das jeweils zu transkribierende Gen geeignete Promotoren.

10

Beispiele für regulierbare Elemente, die konstitutive Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren, die von der RNA-Polymerase II erkannt werden. Solche Promotoren für die konstitutive Expression in allen Zell- und Gewebetypen sind z.B. der CD11c-Promotor, pGk (Phosphoglyceratkinase)-Promotor, der CMV (Cytomegalievirus)-Promotor, der TK (Thymidinkinase)-Promotor, der EF1 α (Elongationsfaktor-1-alpha)-Promotor, der SV40 (Simian Virus)-Promotor, der RSV (Rous Sarcoma Virus)-Promotor und der pUB (Ubiquitin)-Promotor.

15

Beispiele für regulierbare Elemente, die zell- bzw. gewebespezifische Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren oder Aktivatorsequenzen aus Promotoren oder Enhancern von solchen Genen, die für Proteine kodieren, die nur in bestimmten Zelltypen exprimiert werden. Derartige Promotoren sind beispielsweise der Insulin-Promotor für Beta-Zellen des Pankreas, der Sox-2-Promotor für Nervenzellen, der Albuminpromotor für Leberzellen, der Myosin-Schwere-Kette-Promotor für Muskelzellen, der VE-Cadherin-Promotor für Endothelzellen und der Keratinpromotor für Epithelzellen.

20

25

Weitere Beispiele für regulierbare Elemente, die eine regulierbare Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind RU486 induzierbare Promotoren und der Tetra-

cyclinoperator in Kombination mit einem entsprechenden Repressor (Gossen M. et al., (1994) Curr. Opin. Biotechnol. 5, 516-20).

5 Ebenfalls kann die Expression über regulative Nukleotidsequenzen, die Expression mengenmäßig und/oder zeitabhängig beeinflussen, gesteuert werden. Hierzu zählen beispielsweise Enhancersequenzen, Leadersequenzen, Polyadenylierungssequenzen, IRES-Sequenzen und Introns.

10 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein *in vitro*-Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen Säugetierorgans, welches die folgenden Schritte enthält:

- a. Einbringen in mindestens eine Stammzelle, eine Vorläuferzelle und/oder eine immortalisierte Zelle eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder tierischen Säugetierorgans zum einen mindestens eine Nukleinsäure kodierend für ein Fusionsprotein und/oder mindestens einen Vektor enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc-Fragment enthält, und zum anderen mindestens ein geeignetes Differenzierungs-Markergen,
- 15 b. Differenzierung der Zelle aus Schritt a.,
- c. Selektionieren der differenzierten Zelle aus Schritt b. und
- d. Einbringen der selektionierten Zelle aus Schritt c. in mindestens ein humanes oder tierisches organspezifisches Gewebe und/oder in mindestens ein humanes oder tierisches Säugetierorgan.

25

In einer bevorzugten Ausführungsform wird in dem vorangehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren nach, vor oder gleichzeitig mit Schritt a. mindestens ein geeignetes Transfektions-Markergen eingebracht und nach Schritt a. vorzugsweise die transfektierte Zelle aus Schritt a. selektioniert.

30

Geeignete Bedingungen für die Differenzierung der Zellen können beispielsweise durch Zugabe von Wachstumsfaktoren, welche die gewünschte Zelldifferenzierung einleiten, geschaffen werden.

- 5 Dem Fachmann sind zahlreiche Verfahren zur Selektionierung von Zellen bekannt.

Zur Selektion der differenzierten Zellen von anderen Zellen enthält das erfindungsgemäße Verfahren bevorzugt ein positives Selektionsschema. Hierbei wird
10 ein Markergen, beispielsweise ein Gen, welches eine Antibiotika-Resistenz überträgt, vor, während oder nach dem Differenzierungsschritt in Zelle eingebracht und unter geeigneten Bedingungen zur Expression gebracht. Derartige Bedingungen können beispielsweise darin bestehen, dass die Expression des Markergens unter der Kontrolle eines Promoters steht, der nur in den gewünschten Zellen aktiv ist.
15

Durch die Expression des Markergens wird den erfolgreich differenzierten Zellen eine Resistenz für das Antibiotikum übertragen. Die der Differenzierung nachfolgende Selektion der Zellen kann daher beispielsweise leicht durch Inkontaktbringen der Zellen mit dem entsprechenden Antibiotikum erfolgen. Zellen, welche die
20 entsprechende Antibiotika-Resistenz nicht enthalten, sterben ab, so dass lediglich die differenzierten Zellen überleben. Das Inkontaktbringen im Sinne dieser Erfindung kann beispielsweise durch Zugabe der Wirksubstanzen in das Nährmedium einer Zellkultur erfolgen.

25

Unter einem erfindungsgemäßen Antibiotikum wird ein Antibiotikum verstanden, gegen welches das bzw. die als erfindungsgemäße Selektionskassette verwendete(n) Antibiotikum-Resistenzgen(e) eine Resistenz erzeugt/en. Nach Hinzufügen des Antibiotikums zu den kultivierten Stammzellen überleben und differenzieren
30 im wesentlichen nur solche Stammzellen, die den Reporter-Gen-Expressionsvektor enthalten.

Bevorzugt wird ein zweites Markergen in die Zellen eingebracht, wodurch eine Selektion der Zellen, in denen das Einbringen der Nukleinsäure und/oder des Vektors gemäß Schritt a. des Verfahrens erfolgreich verlief, vorgenommen werden
5 kann. Durch diese doppelte Selektion ist es möglich, eine ca. 90%ig, vorzugsweise ca. 95-100%ig reine Zellpopulation der gewünschten Zellen zu erhalten.

Für derartige Selektionierungen können beispielsweise Differenzierungs-Markergene und Transfektions-Markergene verwendet werden. Als solche werden
10 überwiegend Gene verwendet, die eine Resistenz gegen bestimmte toxische Substanzen, beispielsweise Antibiotika, vermitteln, verwendet. Die häufigsten in diesem Zusammenhang verwendeten Antibiotika sind Neomycin, Hygromycin (hph), Zeocin (Sh ble) und Puromycin (pacA).

15 Weitere zur Selektionierung geeignete Gene, insbesondere zur Selektion von Stammzellen, sind beispielsweise Gene, die die Expression von Oberflächenmolekülen oder von Fluoreszenzmarkern, z.B. GFP, regulieren, mit deren Hilfe die zu selektierenden Zellen über Zell-Sortierung aufgereinigt werden können. Weitere Beispiele sind Gene, die für eine Enzymaktivität kodieren, die einen Vorläufer
20 einer toxischen Substanz, sog. "Prodrug" in eine toxische Substanz umwandeln. In diesem Fall kann eine Negativ-Selektion erfolgen, d.h., es überleben nur die Zellen, die den dem Gen vorgeschalteten Promotor nicht exprimieren.

Ein anderer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Erzeugung eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugetieres, welches folgende
25 Schritte enthält:

- a. Einbringen in mindestens eine Oocyte, eine Stammzelle, eine Vorläuferzelle und/oder eine immortalisierte Zelle eines nicht-humanen Säugetieres einerseits
mindestens eine Nukleinsäure, kodierend für ein Fusionsprotein und/oder
30 mindestens einen Vektor enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure,

wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc-Fragment enthält, und andererseits mindestens ein geeignetes Transfektions-Markergen,

- b. Selektionieren der transfektierten Zelle aus Schritt a.,
- c. Einbringen der nach Schritt b. selektierten Zelle in mindestens eine nicht-
5 humane Säugetier-Blastozyte,
- d. Einbringen der Blastozyte aus Schritt c. in eine nicht-humane, vorzugsweise
scheinschwangere, Säugetier-Pflegemutter und
- e. Identifizierung des sich aus genannter Blastozyte entwickelten transgenen
nicht-humanen Säugetiers.

10

Die Verfahren zum Einbringen von Blastozyten sind dem Fachmann bekannt. Es kann beispielsweise durch Injektion erfolgen (Hogan, B., Beddington, R., Constantini, F. und Lacy, E., A laboratory Manual (1994), Cold Spring Harbor Laboratory Press).

15

Die Identifizierung eines transgenen nicht-humanen Säugetiers kann beispielsweise dadurch erfolgen, dass genomische DNA aus dem transgenen nicht-humanen Säugetier extrahiert wird, z.B. aus dem Schwanz einer Maus. In einer nachfolgenden PCR (Polymerase Chain Reaktion) werden Primer verwendet, die spezifisch
20 das Transgen für die erfindungsgemäße Nukleinsäure erkennen. Eine Integration des Transgens kann auf diese Weise nachgewiesen werden.

Eine weitere Möglichkeit der Identifizierung kann mittels Southern Blot erfolgen. Hierbei wird genomische DNA auf eine Membran übertragen und mittels DNA-
25 Sonden, beispielsweise radioaktiv markierte DNA-Sonden, die spezifisch für das gesuchte Transgen sind, detektiert.

Verfahren zur Erzeugung eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugetiers durch Regenerieren einer nicht-humanen Stammzelle, Oocyte, Vorläuferzelle oder immortalisierten Zelle zu einem transgenen nicht-humanen Tier,
30 insbesondere von transgenen Mäusen sind dem Fachmann aus der DE 196 25 049

und den US 4,736,866; US 5,625,122; US 5,698,765; US 5,583,278 und US 5,750,825 bekannt und umfassen transgene Tiere, die beispielsweise durch direkte Injektion von erfindungsgemäßen Expressionsvektoren in Embryonen oder Spermatozyten oder über die Transfektion von Expressionsvektoren in embryonale Stammzellen erzeugt werden können (Polites und Pinkert: DNA Mikroinjection and Transgenic Animal Production, Seite 15-68 in Pinkert, 1994: Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook, Academic Press, San Diego, USA; Houdebine 1997, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands; Doetschman: Gene Transfer in Embryonic Stem Cells, Seite 115-146 in Pinkert, 1994, *supra*; Wood: Retrovirus-Mediated Gene Transfer, Seite 147-176 in Pinkert, 1994, *supra*; Monastersky: Gene Transfer Technology: Alternative Techniques and Applications, Seite 177-220 in Pinkert, 1994, *supra*).

Die Herstellung eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugetiers kann auch durch direkte Injektion einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure in den Pronukleus (Vorkern) eines nicht-humanen Säugetiers erfolgen.

Zahlreiche Verfahren zur Herstellung von transgenen Tieren, insbesondere von transgenen Mäusen, sind dem Fachmann ebenfalls u.a. aus der WO 98/36052, WO 01/32855, DE 196 25 049, US 4,736,866, US 5,625,122, US 5,698,765, US 5,583,278 und US 5,750,825 bekannt und umfassen transgene Tiere, die beispielsweise über direkte Injektion von erfindungsgemäßen Vektoren in Embryonen oder Spermatozyten oder über die Transfektion von Vektoren oder Nukleinsäuren in embryonale Stammzellen erzeugt werden können (Polites und Pinkert, in Pinkert, (1994) Transgenic animal technology, A Laboratory Handbook, Academic Press, London, UK, Seite 15 bis 68; Doetschman, in Pinkert, 1994, *supra*, Seite 115 bis 146).

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein nach vorangehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren erzeugtes transgenes nicht-humanes Säugetier sowie dessen Nachkommen.

In weiteren Ausführungsformen handelt es sich bei der Stammzelle, welche in dem genannten erfindungsgemäßen *in vitro*-Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen Säugetierorgans und in dem Verfahren zur Erzeugung eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugetiers verwendet wird, um eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle.

10 Ein Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen zur Gewinnung einer Zelle, eines organspezifischen Gewebes und/oder eines Säugetierorgans für die Allo- und/oder Xenotransplantation.

15 Im Fall der Zelltransplantation kann diese beispielsweise mittels eines Implantations-Verfahrens oder mittels einer Katheter-Injektion-Methode durch die Blutgefäßwand erfolgen.

Unter Gewinnung im Sinne der vorliegenden Erfindung ist die Entnahme der/des genannten Zelle, Gewebes und/oder Organs aus dem Organismus eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugetiers zu verstehen. Entsprechende Methoden zur Entnahme sind dem Fachmann allgemein geläufig.

25 Ebenfalls ein Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugetiers, eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen Säugetierorgans zum Auffinden von pharmakologisch aktiven Wirkstoffen und/oder zur Identifizierung von toxischen Substanzen.

30 Eine solche Methode könnte zum Beispiel darin bestehen, Zellen der vorliegenden Erfindung auf eine 96-well Mikrotiter-Platte auszusäen, dann eine zu untersu-

chende pharmakologisch aktive oder toxische Substanz zuzugeben und anschließend mittels Zellzahlbestimmung zu analysieren, ob die Substanz einen vermehrten Tod der Zellen bewirkt hat.

- 5 Unter den Begriffen pharmakologisch aktiver Wirkstoff und toxische Substanz im Sinne der Erfindung sind all jene Moleküle, Verbindungen und/oder Zusammensetzungen und Substanzgemische zu verstehen, die unter geeigneten Bedingungen einen pharmakologischen bzw. toxischen Einfluss auf einzelne Zellen, einzelne Gewebe, einzelne Organe oder den gesamten Organismus eines tierischen oder
- 10 humanen Säugetiers ausüben. Mögliche pharmakologisch aktive Wirkstoffe und toxische Substanzen können einfache chemische (organische oder anorganische) Moleküle oder Verbindungen, Nukleinsäuren oder Analoga von Nukleinsäuren, anti-sense Sequenzen von Nukleinsäuren, Peptide, Proteine oder Komplexe und Antikörper sein. Beispiele sind organische Moleküle, die aus Substanz-
- 15 Bibliotheken stammen und die auf ihre pharmakologische bzw. toxische Aktivität hin untersucht werden.

Pharmakologisch aktive Wirkstoffe sind beispielsweise Wirkstoffe, die Einfluss aus üben auf:

- 20 · die Teilungs- und/oder Überlebensfähigkeit von Zellen,
· die Sekretion von Proteinen, z.B. Insulin von Beta-Zellen des Pankreas, Dopamin von Nervenzellen,
· die Muskelzellen-Kontraktion und/oder
· das Wanderungsverhalten von Zellen.
- 25 In Anwendung auf den gesamten Organismus eines tierischen oder humanen Säugetiers ist hierunter ein Einfluss auf beispielsweise
- das Herz-Kreislaufsystem,
 - das Nervensystem sowie
 - die Stoffwechselaktivitäten
- 30 zu verstehen.

Toxische Substanzen sind beispielsweise Wirkstoffe, die

- Zellen nach bestimmten Signalen, beispielsweise Stress, zur Apoptose anregen,
- 5 • das Herz-Kreislaufsystem beeinflussen,
- das Nervensystem beeinflussen und/oder
- die Stoffwechselaktivitäten beeinflussen.

Die identifizierten pharmakologisch aktiven Wirkstoffe und toxischen Substanzen
10 können gegebenenfalls kombiniert oder zusammen mit geeigneten Zusatz- und/oder Hilfsstoffen zur Herstellung eines Diagnostikums oder eines Arzneimittels zur Diagnose, Prophylaxe und/oder Therapie von Transplantationsfolgeerkrankungen und/oder Autoimmunerkrankungen, wie vorangehend beispielhaft aufgeführt, verwendet werden.

15

Die folgenden Figuren und Beispiele sollen die vorliegende Erfindung verdeutlichen ohne sie jedoch zu beschränken.

- Fig. 1a ist eine Abbildung der Aminosäuresequenz WT-IL-15-hIgG1,
20 Fig. 1b ist eine Abbildung der Aminosäuresequenz WT-IL-15-mIgG2a,
Fig. 2a ist eine Abbildung der Aminosäuresequenz WT-IL-15,
Fig. 2b ist eine Abbildung der Aminosäuresequenz hIgG1,
Fig. 2c ist eine Abbildung der Aminosäuresequenz mIgG2a,
Fig. 3a ist eine Abbildung der Aminosäuresequenz Igk8,
25 Fig. 3b ist eine Abbildung der Aminosäuresequenz 149-Fc
Fig. 4 ist eine Abbildung der Nukleinsäuresequenz WT-IL-15-hIgG1,
Fig. 5 ist eine Abbildung der Nukleinsäuresequenz WT-IL-15-mIgG2a,
Fig. 6a ist eine Abbildung der Nukleinsäuresequenz WT-IL-15,
Fig. 6b ist eine Abbildung der Nukleinsäuresequenz hIgG1,
30 Fig. 7 ist eine Abbildung der Nukleinsäuresequenz mIgG2a,

- Fig. 8a ist eine Abbildung der Nukleinsäuresequenz muriner IgK-Leader,
Fig. 8b ist eine Abbildung der Nukleinsäuresequenz humaner CD5-Leader,
Fig. 8c ist eine Abbildung der Nukleinsäuresequenz humaner CD4-Leader,
Fig. 8d ist eine Abbildung der Nukleinsäuresequenz humaner IL-2-Leader,
5 Fig. 9a ist eine Abbildung der Nukleinsäuresequenz humaner MCP-Leader,
Fig. 9b ist eine Abbildung der Nukleinsäuresequenz des kurzen nativen humanen
IL-15-Leaders,
Fig. 9c ist eine Abbildung der Nukleinsäuresequenz des langen nativen humanen
IL-15-Leaders,
10 Fig. 10 ist eine Abbildung der Nukleinsäuresequenz Igk8,
Fig. 11 ist eine Abbildung der Nukleinsäuresequenz 149-Fc,
Fig. 12 ist eine Abbildung der inhibierenden bzw. proliferationsfördernden Wirkung
unterschiedlicher Protein-Konstrukte auf die IL-15 vermittelte Proliferation
von CTLL-2-Zellen.

15

Erläuterung: hIgG1 steht für humanes IgG1 und mIgG2a steht für murines IgG2a.

Weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung betreffen:

- 20 (i) Fusionsprotein aus einem Wildtyp-IL-15 und einem IgG-Fc-Fragment,
mit Ausnahme eines murinen IgG2b-Fc-Fragments.
- (ii) Fusionsprotein nach (i), dadurch gekennzeichnet, dass das IgG-Fc-
Fragment ein humanes oder murines IgG1, ein humanes IgG2, ein mu-
rines IgG2a, ein humanes oder murines IgG3 oder ein humanes IgG4
25 ist.
- (iii) Fusionsprotein nach (i) oder (ii) enthaltend die Aminosäuresequenz
SEQ ID NO:1 oder eine allelische Variante davon.

30

- (iv) Fusionsprotein nach (i) oder (ii) enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO:2 oder eine allelische Variante davon.
- 5 (v) Fusionsprotein nach (i) oder (ii) enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO:3 oder eine allelische Variante davon.
- (vi) Fusionsprotein nach (i) oder (ii) enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO:4 oder eine allelische Variante davon.
- 10 (vii) Fusionsprotein nach (i) oder (ii) enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO:5 oder eine allelische Variante davon.
- (viii) Nukleinsäure kodierend für ein Fusionsprotein nach mindestens einem (i) bis (vii).
- 15 (ix) Nukleinsäure nach (viii) enthaltend die DNA-Sequenz SEQ ID NO:6. oder eine allelische Variante davon.
- (x) Nukleinsäure nach (viii) enthaltend die DNA-Sequenz SEQ ID NO:7. oder eine allelische Variante davon.
- 20 (xi) Nukleinsäure nach (viii) enthaltend die DNA-Sequenz SEQ ID NO:8. oder eine allelische Variante davon.
- (xii) Nukleinsäure nach (viii) enthaltend die DNA-Sequenz SEQ ID NO:9. oder eine allelische Variante davon.
- 25 (xiii) Nukleinsäure nach (viii) enthaltend die DNA-Sequenz SEQ ID NO:10. oder eine allelische Variante davon.
- 30 (xiv) Fusionsprotein kodiert von einer Nukleinsäure nach einem (ix)-(xiii).

- (xv) Vektor enthaltend mindestens eine Nukleinsäure nach mindestens einem (viii) bis (xiv).
- 5 (xvi) Zelle enthaltend mindestens eine Nukleinsäure nach mindestens einem (xiii) bis (xiv) und/oder mindestens einen Vektor nach (xv).
- (xvii) Zelle nach (xvi), dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Zelle um eine Stammzelle, eine Vorläuferzelle und/oder eine immortalisierte Zelle handelt.
- 10 (xviii) Zelle nach (xvii), dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle handelt.
- 15 (xix) Zelle nach mindestens einem (xvi) bis (xviii) in Form einer Zelllinie.
- (xx) Arzneimittel enthaltend mindestens ein Fusionsprotein nach einem (i) bis (vii) und (xiv), mindestens eine Nukleinsäure nach einem (viii) bis (xiii), mindestens einen Vektor nach (xv) und/oder mindestens eine Zelle nach einem (xvi) bis (xviii) und geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.
- 20 (xxi) Humanes oder tierisches organspezifisches Gewebe und/oder humanes oder tierisches Säugetierorgan enthaltend mindestens ein Fusionsprotein, insbesondere nach einem (i)-(vii) und (xiv), mindestens eine Nukleinsäure kodierend für das genannte Fusionsprotein, insbesondere nach einem (viii)-(xiii), mindestens einen Vektor enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure, insbesondere nach (xv), und/oder
- 25 mindestens eine Zelle, insbesondere nach einem (xvi)-(xviii), enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder mindestens ei-
- 30

nen genannten Vektor, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc-Fragment enthält.

- 5 (xxii) Transgenes nicht-humanes Säugetier enthaltend mindestens ein Fusionsprotein, insbesondere nach einem (i)-(vii) und (xiv), mindestens eine Nukleinsäure kodierend für das genannte Fusionsprotein, insbesondere nach einem (viii)-(xiii), mindestens einen Vektor, insbesondere nach (xv), enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder mindestens eine Zelle, insbesondere nach einem (xvi)-(xviii), enthal-
- 10 tend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder mindestens einen genannten Vektor, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc-Fragment enthält.
- 15 (xxiii) Verwendung eines Fusionsproteins, insbesondere nach einem (i)-(vii) und (xiv), einer Nukleinsäure, insbesondere nach einem (viii)-(xiii), eines Vektors, insbesondere nach einem (xv), und/oder einer Zelle, insbesondere nach einem (xvi)-(xviii), wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc-Fragment enthält oder eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder
- 20 tierischen Säugetierorgans nach (xxi) zur Herstellung eines Medikamentes zur Inhibierung eines IL-15 vermittelten zellulären Ereignisses.
- 25 (xxiv) Verwendung eines Fusionsproteins, insbesondere nach einem (i)-(vii) und (xiv), einer Nukleinsäure, insbesondere nach einem (viii)-(xiii), eines Vektors, insbesondere nach (xv), und/oder einer Zelle, insbesondere nach einem (xvi)-(xviii), wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc Fragment enthält oder eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder tierischen Säugetierorgans nach (xxi), zur Herstellung eines Medikamentes zur
- 30 Inhibierung der Interaktion eines IL-15 mit seinem Rezeptor.

- 5 (xxv) Verwendung eines Fusionsproteins, insbesondere nach einem (i)-(vii) und (xiv), einer Nukleinsäure, insbesondere nach einem (viii)-(xiii), eines Vektors, insbesondere nach einem (xv), und/oder einer Zelle, insbesondere nach einem (xvi)-(xviii), wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc Fragment enthält, zur Herstellung eines Medikamentes zur Lyse von Zellen, die einen IL-15-Rezeptor exprimieren.
- 10 (xxvi) Verwendung eines Fusionsproteins, insbesondere nach einem (i)-(vii) und (xiv), einer Nukleinsäure, insbesondere nach einem (viii)-(xiii), eines Vektors, insbesondere nach (xv), und/oder einer Zelle, insbesondere nach einem (xvi)-(xviii), wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc Fragment enthält oder eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder tierischen
- 15 Säugetierorgans nach (xxi), zur Herstellung eines Medikamentes zur Prophylaxe und/oder Therapie von Transplantationsfolgeerkrankungen und/oder Autoimmunerkrankungen.
- 20 (xxvii) Verwendung eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder humanen oder tierischen Säugetierorgans nach (xxi) zur Transplantation in ein humanes oder tierisches Säugetier.
- (xxviii) Verwendung nach (xxvii), dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine Auto-, Allo- oder Xenotransplantation handelt.
- 25 (xxix) Verfahren zur Herstellung eines Fusionsproteins nach mindestens einem (i) bis (vii) und (xiv) enthaltend folgende Schritte:
- a. Einbringen mindestens einer Nukleinsäure nach einem (viii) bis (xiii) und/oder mindestens eines Vektors nach (xv) in eine Zelle, und
- 30 b. Expression der Nukleinsäure unter geeigneten Bedingungen.

(xxx) *In vitro*-Verfahren zur Herstellung eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder humanen oder tierischen Säugetierorgans nach (xxi) enthaltend die folgenden Schritte:

- 5 a. Einbringen in mindestens eine Stammzelle, eine Vorläuferzelle und/oder eine immortalisierte Zelle eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder humanen oder tierischen Säugetierorgans zum einen mindestens eine Nukleinsäure kodierend für ein Fusionsprotein, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc Fragment enthält und/oder mindestens einen Vektor enthaltend mindestens eine genannte
- 10 Nukleinsäure, insbesondere nach einem (viii)-(xiii), und zum anderen mindestens ein geeignetes Differenzierungs-Markergen,
- b. Differenzierung der Zelle aus Schritt a.,
- c. Selektionieren der differenzierten Zelle aus Schritt b. und
- 15 d. Einbringen der selektionierten Zelle aus Schritt c. in ein humanes oder tierisches organspezifisches Gewebe und/oder in ein humanes oder tierisches Säugetierorgan.

(xxxi) Verfahren nach (xxx), dadurch gekennzeichnet, dass nach, vor oder gleichzeitig mit Schritt a. mindestens ein geeigneten Transfektions-

20 Markergen eingebracht wird und nach Schritt a. vorzugsweise die transfektierte Zelle aus Schritt a. selektioniert wird.

(xxxii) Verfahren nach einem (xxx) oder (xxxi), dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle handelt.

25

(xxxiii) Verfahren zur Erzeugung transgener nicht-humaner Säugetiere nach (xxii) enthaltend folgende Schritte:

- 30 a. Einbringen in mindestens eine Oocyte, eine Stammzelle, eine Vorläuferzelle und/oder eine immortalisierte Zelle eines nicht-humanen Säugetieres einerseits mindestens eine Nukleinsäure, insbesondere nach einem

(vii)-(xiii), kodierend für ein Fusionsprotein und/oder mindestens einen Vektor, insbesondere nach (xv), enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc-Fragment enthält, und andererseits mindestens ein geeignetes Transfektions-Markergen,

5

- b. Selektionieren der transfektierten Zelle aus Schritt a.,
- c. Einbringen der nach Schritt b. selektierten Zelle in mindestens eine nicht-humane Säugetier-Blastozyte,
- d. Einbringen der Blastozyte aus Schritt c. in eine nicht-humane Säugetier-Pflegemutter und
- e. Identifizierung des sich aus genannter Blastozyte entwickelten transgenen nicht-humanen Säugetiers.

10

15

(xxxiv) Verfahren nach (xxxiii), dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle handelt.

20

(xxxv) Transgenes nicht-humanes Säugetier, dadurch gekennzeichnet, dass es nach dem Verfahren nach einem (xxxiii) oder (xxxiv) erzeugt wurde.

25

(xxxvi) Transgenes nicht-humanes Säugetier, dadurch gekennzeichnet, dass es ein Nachkomme des Säugetieres nach (xxxv) ist.

(xxxvii) Verwendung eines transgenen nicht-humanen Säugetiers nach mindestens einem (xxii), (xxxv) oder (xxxvi) zur Gewinnung einer Zelle, eines organspezifischen Gewebes und/oder eines Säugetierorgans für die Allo- und/oder Xenotransplantation.

30

(xxxviii) Verwendung eines transgenen nicht-humanen Säugetiers nach einem (xxii), (xxxv) oder (xxxvi), eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder tierischen Säugetiers.

tierorgans nach (xxi) zum Auffinden von pharmakologisch aktiven Wirkstoffen und/oder zur Identifizierung von toxischen Substanzen.

Beispiele

5

Reagenzien

Reagenzien wie Zellkulturmedien, Enzyme, etc. wurden, wenn nicht anders vermerkt, bei Invitrogen (vormals Gibco BRL/Life Technologies), Paisley, UK, bezogen, Laborchemikalien bei Roth (Karlsruhe, DE).

10

Beispiel 1: Austausch der Signalsequenz

Ausgegangen wurde von einem Plasmid, das im Vektor pSecTagA (Invitrogen, Paisley, UK) die cDNA eines Fusionsproteins aus einem mutierten humanen IL-15 und einem murinen IgG2a-Fc-Teil (Hinge-C2-C3, Kim et al. 1998, supra) ent-
15 hielt. Die Fusion von IL-15 mit dem Fc-Teil erfolgte über eine BamHI-Schnittstelle wodurch am Übergang eine zusätzliche Aminosäure (Aspartat) eingefügt wurde.

Im IL-15 waren an den Positionen 149 und 156 (entspricht den Positionen 101
20 und 108 nach Abspalten der Signalsequenz) zwei Glutaminreste zu Aspartat mutiert worden um eine Bindung des Proteins an die alpha-Untereinheit des IL-15 Rezeptors zu ermöglichen, jedoch die Signaltransduktion über die beta- und gamma-Untereinheit zu verhindern. Vom humanen IL-15 war die native, wenig effiziente Signalsequenz entfernt worden und entsprechend die trunkierte cDNA
25 über die Schnittstellen HindIII und XbaI in den pSecTagA-Vektor kloniert worden, so dass der im Plasmid vorliegende Ig-kappa-Leader als Sekretionssignal genutzt werden konnte. Zwischen dem im Plasmid vorliegenden Ig-kappa-Leader und dem Beginn der IL15-Sequenz lagen klonierungsbedingt 10 zusätzliche Aminosäuren vor. Um diese zu entfernen und um möglicherweise die Sekretion des

Proteins zu verbessern, wurde der Ig-kappa-Leader gegen Signalsequenzen verschiedener anderer Proteine ausgetauscht. Dabei kann neben dem ursprünglichen Ig-kappa-Leader bei dem nur die zusätzlichen Aminosäuren entfernt wurden, alternativ die Leadersequenzen von humanem IL-2, MCP-1, CD4 und CD5 einkloniert werden.

Beispiel 2: Vorbereitung des pSecTagA-Plasmids

Da die Klonierung der Signalsequenz über eine singuläre NheI-Schnittstelle, welche in 5'-Richtung des ATG-Startcodons der Leadersequenz liegt, und eine im 5'-Bereich der IL-15-Sequenz liegende BglII-Schnittstelle erfolgen sollte, wurde zunächst eine weitere BglII-Schnittstelle aus dem Vektor pSecTagA entfernt. Dazu wurde der Vektor pSecTagA ohne Insert mit BglII geschnitten (Ansatz: 9 µg DNA, 4 µl 10x Puffer 2, 26 µl Wasser, 4 µl BglII (40 Units) in insgesamt 40 µl, Inkubation für 2 h bei 37°C).

15

Die DNA wurde über eine Pharmacia S400 Microspin-Säule (Amersham-Pharmacia, Freiburg) von Enzym und Puffer gereinigt. 40 µl des Ansatzes wurden mit 5 µl 10x PCR-Puffer (Taq-Core-Kit, Qiagen, Hilden), 2 µl dNTPs (10 mM each, Taq-Core-Kit, Qiagen), 2 µl Wasser und 1 µl (4 Units) DNA Polymerase I (Klenow Fragment) versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert um die BglII-Schnittstelle aufzufüllen. Anschließend wurde das Plasmid auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und die Bande mit Hilfe des Concert Rapid-Gel-Extraction Systems aus dem Gel eluiert. Der gesamte Ansatz wurde in 100 µl Wasser aufgenommen. 7,5 µl davon wurden zusammen mit 7,5 µl Wasser, 4 µl 5x T4-Ligase-Puffer und 1 µl T4-Ligase (1U) für 1h bei Raumtemperatur ligiert. Die Hälfte des Ligationssatzes wurde nach den Angaben des Herstellers in E.coli XL1 Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert.

- 37 -

In das so entstandene Plasmid wurde das gesamte Insert des oben genannten Plasmids: Ig-kappa-Leader + 10 zusätzliche Aminosäuren-mutIL-15-mIgG2a über die Schnittstellen NheI und XbaI wieder einkloniert. Anschließend wurde der ursprüngliche Ig-kappa Leader + 10 Aminosäuren + 5'-IL-15 Teil über einen
5 NheI/BglII-Schnitt entfernt und durch eine Oligonukleotidklonierung durch die oben genannten Signalsequenzen ersetzt.

Beispiel 3: Klonierung des Ig-kappa-Leaders

Das Fragment lautete wie folgt: 5'-NheI-Leader-IL-15-3' mit einer BglII Schnittstelle im 5'-Abschnitt des IL-15 . Da dieses Fragment zu lang war, um durch ein einziges Oligonukleotid abgedeckt zu werden, wurden zwei überlappende Oligos und deren komplementäre Stränge (insgesamt 4 Oligonukleotide) bei MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen (Sequenz der Oligonukleotide s.u.). Die einzelsträngigen Oligonukleotide wurden so gewählt, dass bereits überhängende Enden zum
15 Klonieren in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen (NheI, BglII) vorlagen. Die Oligonukleotide wurden zunächst phosphoryliert. Dazu wurden 10 µg jedes Oligos in einem 20 µl Ansatz mit 2 µl 10x Forward-Puffer und 1 µl T4-Polynukleotidkinase (10 U) für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden äquimolare Mengen von jeweils Strang- und Gegenstrang-Oligo durch Erhitzen auf
20 95°C und langsames Abkühlen auf Raumtemperatur annealt. Vor dem Klonieren in den Vektor wurden die doppelsträngigen Oligonukleotide über Nacht ligiert. Es wurden jeweils 5 µl der 5'-und 3'- doppelsträngigen Oligos + 4 µl 5x T4-Ligase-Puffer + 5 µl Wasser + 1 µl T4-Ligase (1 U) über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Ligationsansatz auf einem 2 % Agarosegel aufgetrennt und
25 Oligodimere mit Hilfe des Concert Rapid-Gel-Extraction Systems aus dem Gel eluiert und im Endvolumen von 40 µl aufgenommen. Die Oligodimere wurden dann in die Klonierung eingesetzt: Es wurde über Nacht bei 12°C ligiert (10 µl Oligodimer, 4 µl 5x T4-Ligase-Puffer, 4 µl Wasser, 1 µl NheI/BglII geschnittenes Plasmid, 1 µl T4-Ligase (1 U)). Von einem 20 µl -Ligationsansatz wurden 5 µl in

- 38 -

die Transformation von E.coli-XL10-Gold (Stratagene, nach Anleitung des Herstellers) eingesetzt.

5 Sequenzen der Ig-kappa-Oligonukleotide:

5'- Ig-kappa fwd

ctagccaccatggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggtccagggtccactggtgacaa

komplementär Ig-kappa rev:

10 ccagttgtcaccagtggaaacctggaacccagagcagcagtagccatagcaggagtgtgtctgtctccatggtgg

zweites Forward Oligo 3'-IL-15 fwd1.1:

ctgggtgaatgtaataagtattgaaaaaaattga

15 komplementär IL-15 rev1.1

gatcttcaattttttcaaatacacttattacattcac

Nach Annealing und Ligation ergibt sich das folgende Fragment:

5'-NheI-Ig-kappa-Leader-IL-15-BglII-3' mit der Sequenz (doppelsträngig)

20 5' - CTAGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGG
TTCCAGGTTCCTACTGGTGACAACTGGGTGAATGTAATAAGTGATTGAAAAAAAT
 TGAA-3'

komplementär:

25 3' -GGTGGTACCTCTGTCTGTGTGAGGAGCATACCCATGACGACGAGACCCAAGG
TCCAAGGTGACCACTGAAGACCCACTTACATTATTCACTAACTTTTTTAACTT
CTAG-5'

Erläuterung:

kursiv+unterstrichen: Schnittstellen NheI bzw. BglII; fett gedruckt: Ig-kappa-Leader.

- 5 Die erhaltenen Klone wurden in der Miniprep (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden) auf ihr Restriktionsmuster hin untersucht. Dazu wurde ein Dreifachverdau mit NheI/BglII (Restriktionsenzyme, die direkt den eingesetzten Leader wieder ausschneiden) und XbaI (schneidet 3' des Fc-Teils) durchgeführt.

- Die DNA positiven Klone wurde über den Qiagen-Endofree-Maxi-Kit nach den
10 Angaben des Herstellers isoliert und bei GATC (Konstanz) sequenziert. Das so entstandene Plasmid (mutIL-15 101/108)-mIgG2a mit bereinigtem Ig-kappa-Leader wurde Igk8 genannt.

Genauso wie für das beschriebene Ig-kappa-Konstrukt wurde auch für die anderen Leader verfahren.

15

Beispiel 4 Herstellung der Konstrukte: WT-Fc und 149-Fc:

- Ausgehend vom oben beschriebenen Plasmid Igk8 wurde mittels PCR mit Hilfe eines Forward-Primers mit BglII-Schnittstelle am 5'-Ende (IL-15fw3.1: 5'-attgaagatcttattcaatctatgc-3') und entsprechender 3'-Reverse-Primer (WT: 5'-ggatccgaagtgttgatgaacatttgacaatatgtacaaaactctgcaaaaattc-3'), (149: 5'-gggatccgaagtgttgatgaacatttgga-3') die Einzelmutanten hergestellt.
20

- Als Template für die PCR-Reaktion wurden pro 25 µl-Ansatz 10 ng mutIL-15(101, 108)-murin Fc-Plasmid sowie jeweils 25 pmole Primer, 0,5 µl dNTPs (Taq-Core-Kit, Qiagen) und 2,5 µl 10x PCR-Puffer, 0,9 U Taq Polymerase (Expand High-Fidelity-System, Roche, Mannheim) eingesetzt. Die DNA wurde in 30
25 Zyklen unter den Bedingungen: 45 Sekunden Denaturierung bei 95°C, 60 Sekunden Annealing bei 60 °C und 45 Sekunden Synthese bei 72°C amplifiziert, anschließend über ein Agarose-Gel aufgereinigt, die PCR-Bande aus dem Gel eluiert und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. 25 µl des Ansatzes wurden mit 3 µl
30 10xPuffer 3 und jeweils 15 U BamHI und BglII versetzt und für 1 Stunde bei

37°C inkubiert. Die DNA wurde über eine Pharmacia Microspin S400 Säule aufgereinigt. Aus dem Plasmid Igk8 wurde der IL-15-Anteil mit Doppelmutation ebenfalls durch einen Doppelverdau BglII/BamHI ausgeschnitten und durch den IL-15-Teil mit Einzelmuation oder Wildtypsequenz ersetzt. Die Identität der Plasmide wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Beispiel 5: Herstellung von Protein:

Durch transiente Transfektion von HEK293-Zellen (ATCC, Manassas, USA) wurden die Proteine der Einzelmuanten hergestellt: Dazu wurden pro 150cm² 10 Platte 60 µl Lipofectamin2000 in 2 ml Optimem 1-Medium- und 30 µg Plasmid-DNA (IgK8, WT-Fc, 149-Fc) ebenfalls in 2 ml Optimem 1-Medium verdünnt. Die beiden Lösungen wurden gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das DNA/Liposomen-Gemisch auf zu ca. 80% konfluente 150cm² HEK-293-Platten ins Zellkulturmedium (Dulbecco's MEM+Glutamax+ 15 10%FCS+1% Pen/Strep) gegeben. Nach einem Tag wurde ein Mediumwechsel gegen Ultraculture-Medium (Biowhittaker, Verviers, Belgien) durchgeführt und anschließend das Zellkulturmedium für 4 Tage auf den Zellen belassen. Der Zellkulturüberstand wurde gesammelt, über einen Faltenfilter (Schleicher und Schüll, Dassel) gegeben um die groben Zellbestandteile zu entfernen, dann über einen 20 µm-Bottle Top-Filter (Nalgene-Nunc, Wiesbaden) sterilfiltriert und das IL-15-Fc-Fusionsprotein mittels Aufreinigung über Protein-A-Sepharose isoliert. Dazu wurden pro Liter Zellkulturüberstand 0,4 ml in Waschpuffer (20 mM Tris/HCl, pH 8,5, 130 mM NaCl) gequollene Protein A-Sepharose (Amersham-Pharmacia, 50% v/v in Waschpuffer) zugegeben und der Ansatz bei 4°C über Nacht in einem 25 Überkopfschüttler geschüttelt. Die ProteinA-Sepharose wurde in einer leeren Chromatographie-Säule aufgefangen und mit mindestens 150 ml Waschpuffer gewaschen. Das Protein wurde von der Säule mit 0,1 M Glycin pH 2,5 in 1 ml Fraktionen eluiert und sofort mit 60 µl 1M Tris/HCl, pH 9,5 neutralisiert. Das Protein wurde gegen PBS-Puffer dialysiert und sterilfiltriert. Im BCA-Assay 30 (Pierce, Rockford, USA) wurde die Konzentration des Proteins bestimmt und

mittels Silbergel und Western Blot (Erstantikörper: monoklonaler Maus anti-human IL-15, BD Biosciences Pharmingen, San Diego USA, Zweitantikörper: POD-Goat anti Maus, Dianova, Hamburg) Reinheit und Identität überprüft. Anschließend wurde die Funktionalität des Proteins im Proliferationsassay untersucht.

Beispiel 6: Proliferationsassay:

CTLL-2 Zellen (ATCC) sind murine cytotoxische T-Zellen, deren Proliferation abhängig von IL-15 oder IL-2, ist und die daher als Indikatoren für die proliferationsinhibierende Wirkung antagonistischer Proteine dienen können. Die Zellen wurden in einem Medium kultiviert, das aus RPMI1640-Medium + 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS) + 1% Pen/Strep + 20% Rät T-Stim with ConA (Becton Dickinson Labware, Bedford, USA), einem Gemisch verschiedener Wachstumsfaktoren, besteht.

Für das Ansetzen eines Proliferationsassays wurden die Zellen von restlichen, für die Kultur der Zellen nötigen Wachstumsfaktoren befreit, indem sie zweimal mit Zellkulturmedium (RPMI 1640+10%FCS+1%Pen/Strep) gewaschen und dann auch in diesem Medium aufgenommen wurden. Dazu wurden die Zellen bei 349g für 5 min zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet wieder in Zellkulturmedium aufgenommen. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt.

Der Assay erfolgte in Flachboden 96 well-Platten und es wurden pro well 150µl Medium mit 3×10^4 Zellen/well eingesetzt. Für die Negativkontrolle erhielten die Zellen nur Medium mit 10% FCS, ohne zusätzliche Faktoren. Die Positivkontrolle enthielt zusätzlich rekombinantes humanes IL-15 (R&D Systems, Minneapolis, USA) in einer eine halbmaximale Proliferation der Zellen zulassenden Konzentration (z.B. 12,5 pg/well). Negativ- und Positivkontrolle wurden jeweils in 6-fach-Ansätzen pipettiert.

Zur Bestimmung der proliferationsinhibierenden Wirkung der oben genannten neuen IL-15-Fc Varianten wurden die Zellen wie für die Positivkontrolle be-

schrieben mit rekombinantem IL-15 versetzt und erhielten zusätzlich gereinigtes Protein der Doppelmutante 101/108 ausgehend von Igk8, des Wildtyp-Proteins (WT-Fc) oder der Einzelmutante (149-Fc). Es wurde dabei als höchste Konzentration 2 µg pro well eingesetzt und weiter jeweils 1:2 Verdünnungen (1 µg, 0,5 µg, 5 0,25 µg, 0,125 µg, etc.). Zur Kontrolle wurden in denselben Konzentrationen die folgenden verwandten Proteine eingesetzt: als unspezifischer Antikörper wurde mIgG2a (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) eingesetzt, zudem wurde IL-2-Fc, das einen nicht-mutierten Cytokin-Anteil enthält und somit die Proliferation der Zellen stimulieren sollte sowie CTLA4-Fc eingesetzt, ebenfalls ein struk- 10 turell verwandtes Fusionsprotein, das jedoch die Proliferation nicht beeinflussen sollte. Beide letztgenannten Proteine wurden bei Chimerigen (Allston, USA) bezogen. Alle Ansätze wurden in Triplikaten pipettiert.

Die Zellen wurden für 44 ± 2 Stunden bei 37°C im CO₂-Brutschrank inkubiert und anschließend wurde die Proliferation mit Hilfe des XTT-Cell Proliferation 15 Kits (Roche) nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Dazu wurden die beiden Komponenten des Kits im Verhältnis 1:50 gemischt (d.h., 75 µl XTT-Labelling-Reagenz + 1,5 µl Electron Coupling Reagenz). Pro well wurden 75 µl der Mischung zugegeben und die Platte nach einer Inkubation für 4 Stunden bei 37°C im CO₂-Inkubator im ELISA-Reader bei 490 gegen 690 nm gemessen.

20

Das Ergebnis ist in Figur 23 dargestellt:

WT-Fc, 149-Fc und Protein der Doppelmutante 101/108 (Plasmid Igk8) zeigen eine inhibierende Wirkung auf die IL-15 vermittelte Proliferation von CTLL-2 Zellen. IL-2-Fc und IgG2a zeigen eine eher proliferationsfördernde Wirkung.

25 Neg: die Zellen wurden ohne rekombinantes humanes IL-15 kultiviert.

Pos: die Zellen erhielten 12,5 pg/well rekombinantes humanes IL-15.

Alle Zellen der weiteren Ansätze erhielten 12,5 pg/well rekombinantes humanes IL-15 + das angegebene Protein in den Konzentrationen (von links nach rechts): 2

- 43 -

μg , 1 μg , 0,5 μg , 0,25 μg , 0,125 μg , 0,0625 μg . CTLA4-Fc zeigte keine Wirkung, alle Werte lagen im Bereich der Positivkontrolle (Daten nicht gezeigt).

Patentansprüche

1. Fusionsprotein aus einem Wildtyp-IL-15 und einem IgG-Fc-Fragment, mit
5 Ausnahme eines murinen IgG2b-Fc-Fragments.
2. Fusionsprotein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das IgG-Fc-Fragment ein humanes oder murines IgG1, ein humanes IgG2, ein murines IgG2a, ein humanes oder murines IgG3 oder ein humanes IgG4 ist.
10
3. Fusionsprotein nach Anspruch 1 oder 2 enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO:1 oder eine allelische Variante davon.
4. Fusionsprotein nach Anspruch 1 oder 2 enthaltend die Aminosäuresequenz
15 SEQ ID NO:2 oder eine allelische Variante davon.
5. Fusionsprotein nach Anspruch 1 oder 2 enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO:3 oder eine allelische Variante davon.
- 20 6. Fusionsprotein nach Anspruch 1 oder 2 enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO:4 oder eine allelische Variante davon.
7. Fusionsprotein nach Anspruch 1 oder 2 enthaltend die Aminosäuresequenz
25 SEQ ID NO:5 oder eine allelische Variante davon.
8. Nukleinsäure kodierend für ein Fusionsprotein nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7.
9. Nukleinsäure nach Anspruch 8 enthaltend die DNA-Sequenz SEQ ID
30 NO:6. oder eine allelische Variante davon.

10. Nukleinsäure nach Anspruch 8 enthaltend die DNA-Sequenz SEQ ID NO:7. oder eine allelische Variante davon.
- 5 11. Nukleinsäure nach Anspruch 8 enthaltend die DNA-Sequenz SEQ ID NO:8. oder eine allelische Variante davon.
12. Nukleinsäure nach Anspruch 8 enthaltend die DNA-Sequenz SEQ ID NO:9. oder eine allelische Variante davon.
- 10 13. Nukleinsäure nach Anspruch 8 enthaltend die DNA-Sequenz SEQ ID NO:10. oder eine allelische Variante davon.
14. Fusionsprotein kodiert von einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 9-13.
- 15 15. Vektor enthalten mindestens eine Nukleinsäure nach mindestens einem der Ansprüche 8 bis 14.
16. Zelle enthaltend mindestens eine Nukleinsäure nach mindestens einem der Ansprüche 8 bis 14 und/oder mindestens einen Vektor nach Anspruch 15.
- 20 17. Zelle nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Zelle um eine Stammzelle, eine Vorläuferzelle und/oder eine immortalisierte Zelle handelt.
- 25 18. Zelle nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle handelt.
- 30 19. Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 16 bis 18 in Form einer Zelllinie.

20. Arzneimittel enthaltend mindestens ein Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 7 und 14, mindestens eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 8 bis 13, mindestens einen Vektor nach Anspruch 15 und/oder
5 mindestens eine Zelle nach einem der Ansprüche 16 bis 18 und geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.
21. Humanes oder tierisches organspezifisches Gewebe und/oder humanes oder tierisches Säugetierorgan enthaltend mindestens ein Fusionsprotein,
10 insbesondere nach einem der Ansprüche 1-7 und 14, mindestens eine Nukleinsäure kodierend für das genannte Fusionsprotein, insbesondere nach einem der Ansprüche 8-13, mindestens einen Vektor enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure, insbesondere nach Anspruch 15, und/oder mindestens eine Zelle, insbesondere nach einem der Ansprüche
15 16-18, enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder mindestens einen genannten Vektor, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc-Fragment enthält.
22. Transgenes nicht-humanes Säugetier enthaltend mindestens ein Fusionsprotein, insbesondere nach einem der Ansprüche 1-7 und 14, mindestens
20 eine Nukleinsäure kodierend für das genannte Fusionsprotein, insbesondere nach einem der Ansprüche 8-13, mindestens einen Vektor, insbesondere nach Anspruch 15, enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder
25 mindestens eine Zelle, insbesondere nach einem der Ansprüche 16-18, enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder mindestens einen genannten Vektor, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc-Fragment enthält.
- 30 23. Verwendung eines Fusionsproteins, insbesondere nach einem der Ansprüche 1-7 und 14, einer Nukleinsäure, insbesondere nach einem der Ansprü-

5 che 8-13, eines Vektors, insbesondere nach einem Anspruch 15, und/oder einer Zelle, insbesondere nach einem der Ansprüche 16-18, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc-Fragment enthält oder eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder tierischen Säugetierorgans nach Anspruch 21 zur Herstellung eines Medikamentes zur Inhibierung eines IL-15 vermittelten zellulären Ereignisses.

10 24. Verwendung eines Fusionsproteins, insbesondere nach einem der Ansprüche 1-7 und 14, einer Nukleinsäure, insbesondere nach einem der Ansprüche 8-13, eines Vektors, insbesondere nach Anspruch 15, und/oder einer Zelle, insbesondere nach einem der Ansprüche 16-18, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc Fragment enthält oder eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder tierischen Säugetierorgans nach Anspruch 21, zur Herstellung eines Medikamentes zur Inhibierung der Interaktion eines IL-15 mit seinem Rezeptor.

20 25. Verwendung eines Fusionsproteins, insbesondere nach einem der Ansprüche 1-7 und 14, einer Nukleinsäure, insbesondere nach einem der Ansprüche 8-13, eines Vektors, insbesondere nach einem Anspruch 15, und/oder einer Zelle, insbesondere nach einem der Ansprüche 16-18, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc Fragment enthält, zur Herstellung eines Medikamentes zur Lyse von Zellen, die einen IL-15-Rezeptor exprimieren.

30 26. Verwendung eines Fusionsproteins, insbesondere nach einem der Ansprüche 1-7 und 14, einer Nukleinsäure, insbesondere nach einem der Ansprüche 8-13, eines Vektors, insbesondere nach Anspruch 15, und/oder einer Zelle, insbesondere nach einem der Ansprüche 16-18, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc Fragment enthält oder eines huma-

nen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder tierischen Säugetierorgans nach Anspruch 21, zur Herstellung eines Medikamentes zur Prophylaxe und/oder Therapie von Transplantationsfolgeerkrankungen und/oder Autoimmunerkrankungen.

5

27. Verwendung eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder humanen oder tierischen Säugetierorgans nach Anspruch 21 zur Transplantation in ein humanes oder tierisches Säugetier.

10

28. Verwendung nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine Auto-, Allo- oder Xenotransplantation handelt.

29. Verfahren zur Herstellung eines Fusionsproteins nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 und 14 enthaltend folgende Schritte:

15

- a. Einbringen mindestens einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 8 bis 13 und/oder mindestens eines Vektors nach Anspruch 15 in eine Zelle, und
- b. Expression der Nukleinsäure unter geeigneten Bedingungen.

20

30. *In vitro*-Verfahren zur Herstellung eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder humanen oder tierischen Säugetierorgans nach Anspruch 21 enthaltend die folgenden Schritte:

25

- a. Einbringen in mindestens eine Stammzelle, eine Vorläuferzelle und/oder eine immortalisierte Zelle eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder humanen oder tierischen Säugetierorgans zum einen mindestens eine Nukleinsäure kodierend für ein Fusionsprotein, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc Fragment enthält und/oder mindestens einen Vektor enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure, insbesondere nach einem der Ansprüche 8-13, und zum anderen mindestens ein geeignetes Differenzierungs-Markergen,

30

- b. Differenzierung der Zelle aus Schritt a.,
- c. Selektionieren der differenzierten Zelle aus Schritt b. und

- d. Einbringen der selektionierten Zelle aus Schritt c. in ein humanes oder tierisches organspezifisches Gewebe und/oder in ein humanes oder tierisches Säugetierorgan.
- 5 31. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass nach, vor oder gleichzeitig mit Schritt a. mindestens ein geeigneten Transfektions-Markergen eingebracht wird und nach Schritt a. vorzugsweise die transfektierte Zelle aus Schritt a. selektioniert wird.
- 10 32. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 oder 31, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle handelt.
- 15 33. Verfahren zur Erzeugung transgener nicht-humaner Säugetiere nach Anspruch 22 enthaltend folgende Schritte:
- a. Einbringen in mindestens eine Oocyte, eine Stammzelle, eine Vorläuferzelle und/oder eine immortalisierte Zelle eines nicht-humanen Säugetieres einerseits mindestens eine Nukleinsäure, insbesondere nach einem der Ansprüche 8-13, kodierend für ein Fusionsprotein und/oder mindestens einen
- 20 Vektor, insbesondere nach Anspruch 15, enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc-Fragment enthält, und andererseits mindestens ein geeignetes Transfektions-Markergen,
- b. Selektionieren der transfektierten Zelle aus Schritt a.,
- 25 c. Einbringen der nach Schritt b. selektierten Zelle in mindestens eine nicht-humane Säugetier-Blastozyte,
- d. Einbringen der Blastozyte aus Schritt c. in eine nicht-humane Säugetier-Pflegemutter und
- e. Identifizierung des sich aus genannter Blastozyte entwickelten transgenen
- 30 nicht-humanen Säugetiers.

34. Verfahren nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle handelt.
- 5 35. Transgenes nicht-humanes Säugetier, dadurch gekennzeichnet, dass es nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 33 oder 34 erzeugt wurde.
36. Transgenes nicht-humanes Säugetier, dadurch gekennzeichnet, dass es ein Nachkomme des Säugetieres nach Anspruch 35 ist.
- 10 37. Verwendung eines transgenen nicht-humanen Säugetiers nach mindestens einem der Ansprüche 22, 35 oder 36 zur Gewinnung einer Zelle, eines organspezifischen Gewebes und/oder eines Säugetierorgans für die Allo- und/oder Xenotransplantation.
- 15 38. Verwendung eines transgenen nicht-humanen Säugetiers nach einem der Ansprüche 22, 35 oder 36, eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder tierischen Säugetierorgans nach Anspruch 21 zum Auffinden von pharmakologisch aktiven Wirkstoffen und/oder zur Identifizierung von toxischen Substanzen.
- 20

1/12

5 Figur 1 a:

Aminosäuresequenz WT-IL-15-hIgG1:

NWVNVISDLKKTEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCCKVTAMKCFLLLELQVISLESG
DASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMF
10 INTSDPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK

15

Figur 1 b:

Aminosäuresequenz WT-IL-15-mIgG2a:

20 NWVNVISDLKKTEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCCKVTAMKCFLLLELQVISLESG
DASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMF
INTSDPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISSLPIVTCVVVD
VSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFK
CKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDPMPE
25 DIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHE
GLHNHHTTKSFSRTPGK

2/12

5 Figur 2 a:

Aminosäuresequenz WT-IL-15:

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESG
DASIHDVTENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMF

10 INTS

Figur 2 b:

Aminosäuresequenz hIgG1:

15

PKSADKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPFVLDSGSSFYLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNNH

20 TQKSLSLSPGK

Figur 2 c:

Aminosäuresequenz mIgG2a:

25

PRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDD
PDVQISWVFNNEVHHTAQQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNN
KDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVE
WTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNNH

30 HTTKSFSRTPGK

3/12

5 Figur 3 a:

Aminosäuresequenz Igk8

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESG
DASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLDSFVHIVDMF
10 INTSDPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVD
VSEDDPDVQISW FVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFK
CKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLT CMVTDFMPE
DIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHE
GLHNHHTTKSFSRTPGK

15

Figur 3 b:

Aminosäuresequenz 149-Fc

20 NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESG
DASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLDSFVHIVQMF
INTSDPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVD
VSEDDPDVQISW FVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFK
CKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLT CMVTDFMPE
25 DIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHE
GLHNHHTTKSFSRTPGK

4/12

5 Figur 4:

Nukleinsäuresequenz WT-IL-15-hIgG1:

AACTGGGTGAATGTAATAAGTGATTTGAAAAAACCGAAGATCTTATTCAATCTA
TGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTACCCCAGTTGCAAAGT
10 AACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGA
GATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACAACAGTT
TGTCTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGA
GGAAAAAATATTAAAGAATTTTTGCAGAGTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTT
ATCAACACTTCGGATCCCAAATCTGCTGACAAACTCACACATGCCCACCGTGCC
15 CAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAA
GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTG
AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC
ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT
CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
20 AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCA
AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCT
GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC
ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC TACAAGACCACGC
CTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTACCGTGGA
25 CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGATCTA
GA

5/12

5 Figur 5:

Nukleinsäuresequenz WT-IL-15-mIgG2a:

AACTGGGTGAATGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTA
TGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTACCCCAGTTGCAAAGT
10 AACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGA
GATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACAACAGTT
TGTCTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGA
GGAAAAAATATTAAAGAATTTTTGCAGAGTTTTGTACATATTGTCAAATGTTTC
ATCAACACTTCGGATCCCAGAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAAT
15 GCCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGAT
CAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGAT
GTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAG
TACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGT
GGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAA
20 TGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAAAC
CCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGA
GATGACTAAGAAACAGGTCACCTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAA
GACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACA
CTGAACCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGT
25 GGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTTCAGTGGTCCACGAG
GGTCTGCACAATCACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAATGAG

6/12

5 Figur 6 a:

Nukleinsäuresequenz WT-IL-15:

AACTGGGTGAATGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTA
TGCATATTGATGCTACTTTATATACGAAAGTGATGTTACCCCAGTTGCAAAGT
10 AACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGA
GATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACAACAGTT
TGTCTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGA
GGAAAAAATATTAAAGAATTTTTGCAGAGTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTT
ATCAACACTTC

15

Figur 6 b:

Nukleinsäuresequenz hIgG1:

CCCAAATCTGCTGACAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCC
20 TGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT
GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA
AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGT
CCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA
25 GCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG
AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT
CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACT
CCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA
30 GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAT

7/12

5 Figur 7:

Nukleinsäuresequenz mIgG2a:

```
CCCAGAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTCTCCATGCAAATGCCCAGCACCTAACC
TCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCAT
10 GATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGAC
CCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGA
CACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCC
CATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAAC
AAAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGTCAGTAA
15 GAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACA
GGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAG
TGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAGTCCTGG
ACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTG
GGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCAC
20 CACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAATGAG
```

8/12

5 Figur 8 a:

Nukleinsäuresequenz muriner IgK-Leader:

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCA
CTGGTGAC

10

Figur 8 b:

Nukleinsäuresequenz humaner CD5-Leader:

15 ATGCCCATGGGGTCTCTGCAACCGCTGGCCACCTTGACCTGCTGGGGATGCTGG
TCGCTTCCTGCCTCGGA

Figur 8 c:

20 Nukleinsäuresequenz humaner CD4-Leader:

ATGAACCGGGGAGTCCCTTTTAGGCACTTGCTTCTGGTGCTGCAACTGGCGCTCC
TCCCAGCAGCCACTCAGGGA

25

Figur 8 d:

Nukleinsäuresequenz humaner IL-2-Leader:

ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCAATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCACAA
30 ACAGT

9/12

5 Figur 9 a:

Nukleinsäuresequenz humaner MCP-Leader:

ATGAAAGTCTCTGCCGCCCTTCTGTGCCTGCTGCTCATAGCAGCCACCTTCATTC
CCCAAGGGCTCGCT

10

Figur 9 b:

Nukleinsäuresequenz des kurzen nativen humanen IL-15-Leaders:

15 ATGTCTTCATTTTGGGCTGTTTCAGTGCAGGGCTTCCTAA

Figur 9 c:

Nukleinsäuresequenz des langen nativen humanen IL-15-Leaders:

20

ATGAGAATTTGAAACCACATTTGAGAAGTATTTCCATCCAGTGCTACTTGTGTT
TACTTCTAAACAGTCATTTTCTAACTGAAGCTGGCATTTCATGTC'TTCATTTTGGG
CTGTTTCAGTGCAGGGCTTCCTAAAACAGAAGCC

10/12

5 Figur 10:

Nukleinsäuresequenz Igk8

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCAGGTTCCA
CTGGTGACAACCTGGGTGAATGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTAT
10 TCAATCTATGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTACCCCCAGT
TGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTG
AGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAA
CAACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAG
GAACTGGAGGAAAAAATATTAAAGAATTTTTGGACAGTTTTGTACATATTGTCG
15 ACATGTTTCATCAACACTTCGGATCCCAGAGGGGCCACAATCAAGCCCTGTCCCTCC
ATGCAAATGCCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCT
CCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGG
TGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAA
CGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACT
20 CTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGG
AGTTCAAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCAT
CTCAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCA
GAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCA
TGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTA
25 CAAGAACACTGAACCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAG
CTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTTCAGTGG
TCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGG
TAAATGAG

11/12

5 Figur 11:

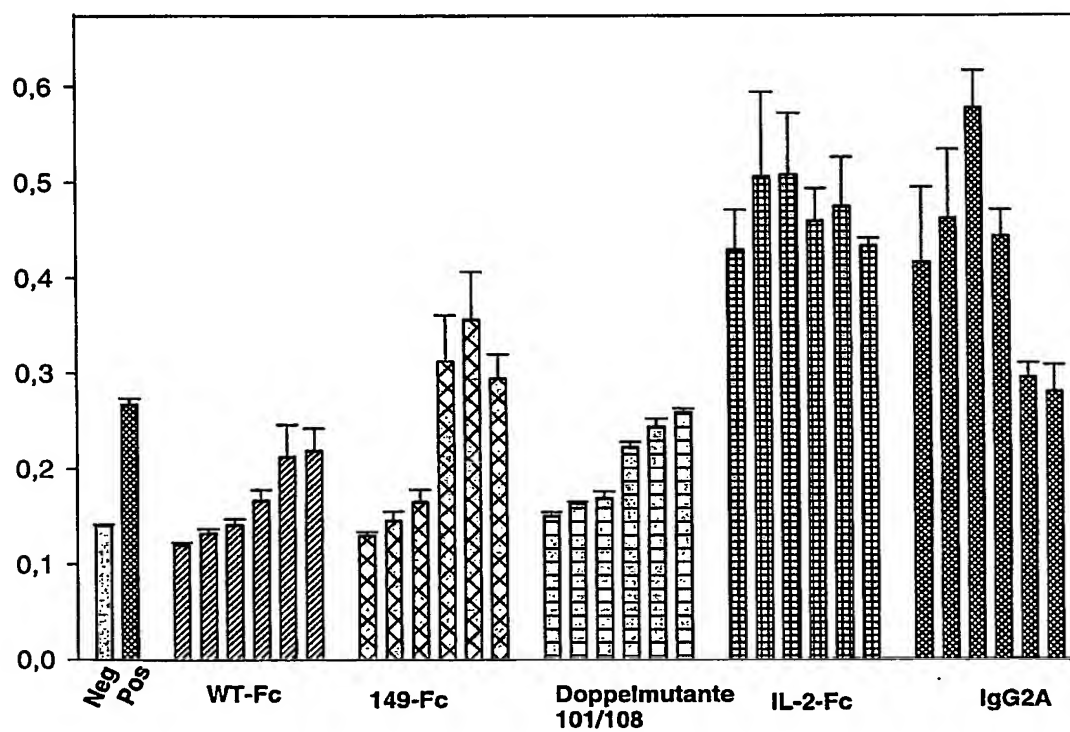
Nukleinsäuresequenz 149-Fc

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCAGGTTCCA
CTGGTGACAACTGGGTGAATGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTAT
10 TCAATCTATGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTACCCCCAGT
TGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTG
AGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAA
CAACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAG
GAACTGGAGGAAAAAATATTAAAGAATTTTTGGACAGTTTTGTACATATTGTCC
15 AAATGTTTCATCAACACTTCGGATCCCAGAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTCCCTCC
ATGCAAATGCCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCT
CCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGG
TGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAA
CGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACT
20 CTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGG
AGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCAT
CTCAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCCTCCACCA
GAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCA
TGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTA
25 CAAGAACACTGAACCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAG
CTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTCAGTGG
TCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGG
TAAATGAG

12/12

5 Figur 12:

Inhibierende bzw. proliferationsfördernde Wirkung unterschiedlicher Protein-Konstrukte auf die IL-15 vermittelte Proliferation von CTLL-2-Zellen:



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. April 2004 (29.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/035622 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07K 14/54**,
19/00, C12N 15/62

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/CH2003/000666

(22) Internationales Anmeldedatum:
13. Oktober 2003 (13.10.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
02022869.8 14. Oktober 2002 (14.10.2002) EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG** [CH/CH]; Gren-
zacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **DREHER, Ingeborg**
[DE/DE]; Gladbacher Strasse 10, 40219 Düsseldorf (DE).
MOLL, Thomas [DE/DE]; Hektorstrasse 17, 10711 Berlin
(DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: **F. HOFFMANN-LA ROCHE**
AG; Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD,
GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 8. Juli 2004

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: **ANTAGONISTS IL-15**

(54) Bezeichnung: **IL-15 ANTAGONISTEN**

(57) Abstract: The invention relates to fusion proteins consisting of a wild-type IL-15 and a IgG-Fc fragment, apart from a mouse IgG2b fragment, nucleic acids encoding said proteins, vectors, modified cells, and also to the use thereof for preparing drugs which are used, for example for preventing and/or curing disorders resulting from a transplantation and/or autoimmune diseases.

(57) Zusammenfassung: Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Fusionsproteine aus einem Wildtyp-IL-15 und einem IgG-Fc-Fragment, mit Ausnahme eines murinen IgG2b-Fc-Fragmentes, Nukleinsäure die für diese Proteine kodieren, Vektoren, transformierte Zellen und deren Verwendung zur Herstellung von Medikamenten, beispielsweise zur Prophylaxe und/oder Therapie von Transplantationsfolgeerkrankungen und/oder Autoimmunerkrankungen.

WO 2004/035622 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/CH/00666

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K14/54 C07K19/00 C12N15/62

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EP0-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>PETTIT DEAN K ET AL: "Structure-function studies of interleukin 15 using site-specific mutagenesis, polyethylene glycol conjugation, and homology modeling" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 4, 1997, pages 2312-2318, XP002042891 ISSN: 0021-9258 abstract page 2314, column 1, last paragraph -page 2315, last paragraph; figures 5,6 --- -/--</p>	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *8* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 May 2004

Date of mailing of the international search report

19/05/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

De Kok, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/CH/00666

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>ZHENG X X ET AL: "IL-2 receptor-targeted cytolytic IL-2/Fc fusion protein treatment blocks diabetogenic autoimmunity in nonobese diabetic mice"</p> <p>JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 163, no. 7, 1 October 1999 (1999-10-01), pages 4041-4048, XP002230805 ISSN: 0022-1767 abstract</p>	1
A	<p>-----</p> <p>RUECKERT R ET AL: "IL-15-IgG2b fusion protein accelerates and enhances a Th2 but not a Th1 immune response in vivo, while IL-2-IgG2b fusion protein inhibits both"</p> <p>EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WEINHEIM, DE, vol. 28, no. 10, October 1998 (1998-10), pages 3312-3320, XP002230807 ISSN: 0014-2980 abstract page 3313, column 1, last paragraph -page 3318, column 1, paragraph 1</p>	1
A	<p>-----</p> <p>WO 97/41232 A (BETH ISRAEL HOSPITAL) 6 November 1997 (1997-11-06) cited in the application the whole document</p> <p>-----</p>	1-16,20, 23-26,29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/CH 03/00666

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claim 27 relates to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the tissue or organ.
2. ☒ Claims Nos.: **1-38, in part**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
See additional sheet
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The current claims 1-38 relate to a fusion protein characterized by a desirable characteristic or property, namely that it consists of a wild-type Il-15 and an IgG-Fc fragment, without defining the amino acid sequence of the wild-type Il-15.

The claims are therefore unclear because this feature is an essential feature of the invention. In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Moreover, the claims also lack the requisite clarity (PCT Article 6) since they attempt to define the fusion protein in terms of the desired result. This lack of clarity too is such that it is impossible to carry out a meaningful search covering the entire scope of protection sought. Therefore, the search was directed to the parts of the claims that appear to be clear, supported or disclosed in the above sense, that is the parts concerning the fusion proteins that contain an Il-15 with the amino acid sequence defined in Seq. Id. No. 1.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/CH/00666

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9741232	A	06-11-1997	CA 2252557 A1 06-11-1997
			EP 0927254 A1 07-07-1999
			JP 2001502521 T 27-02-2001
			WO 9741232 A1 06-11-1997
			US 2003105295 A1 05-06-2003
			US 6451308 B1 17-09-2002
			US 6001973 A 14-12-1999
<hr/>			

INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/CH/00666

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07K14/54 C07K19/00 C12N15/62

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>PETTIT DEAN K ET AL: "Structure-function studies of interleukin 15 using site-specific mutagenesis, polyethylene glycol conjugation, and homology modeling" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 272, Nr. 4, 1997, Seiten 2312-2318, XP002042891 ISSN: 0021-9258 Zusammenfassung Seite 2314, Spalte 1, letzter Absatz -Seite 2315, letzter Absatz; Abbildungen 5,6</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. Mai 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

19/05/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

De Kok, A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	ZHENG X X ET AL: "IL-2 receptor-targeted cytolytic IL-2/Fc fusion protein treatment blocks diabetogenic autoimmunity in nonobese diabetic mice" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, Bd. 163, Nr. 7, 1. Oktober 1999 (1999-10-01), Seiten 4041-4048, XP002230805 ISSN: 0022-1767 Zusammenfassung ---	1
A	RUECKERT R ET AL: "IL-15-IgG2b fusion protein accelerates and enhances a Th2 but not a Th1 immune response in vivo, while IL-2-IgG2b fusion protein inhibits both" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WEINHEIM, DE, Bd. 28, Nr. 10, Oktober 1998 (1998-10), Seiten 3312-3320, XP002230807 ISSN: 0014-2980 Zusammenfassung Seite 3313, Spalte 1, letzter Absatz -Seite 3318, Spalte 1, Absatz 1 ---	1
A	WO 97/41232 A (BETH ISRAEL HOSPITAL) 6. November 1997 (1997-11-06) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-16, 20, 23-26, 29

International Patent Class. No. PCT/CH 03/00666

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

- Feld II** Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefodert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1-38, teilweise

Die geltenden Patentansprüche 1-38 beziehen sich auf ein Fusionsprotein charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich dass es aus einem Wildtyp-I1-15 und einem IgG-Fc-Fragment besteht, ohne die aminosäure Sequenz des Wildtyp-I1-15 zu definieren. Die Patentansprüche sind daher unklar weil diese Sequenz ein wesentliches Merkmal der Erfindung ist. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen daher die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Fusionsprotein über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend die Fusionsproteine die ein I1-15 mit der Aminosäuresequenz definiert in SEQ ID NO:1 enthalten.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9741232	A	06-11-1997	CA	2252557 A1	06-11-1997
			EP	0927254 A1	07-07-1999
			JP	2001502521 T	27-02-2001
			WO	9741232 A1	06-11-1997
			US	2003105295 A1	05-06-2003
			US	6451308 B1	17-09-2002
			US	6001973 A	14-12-1999

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.